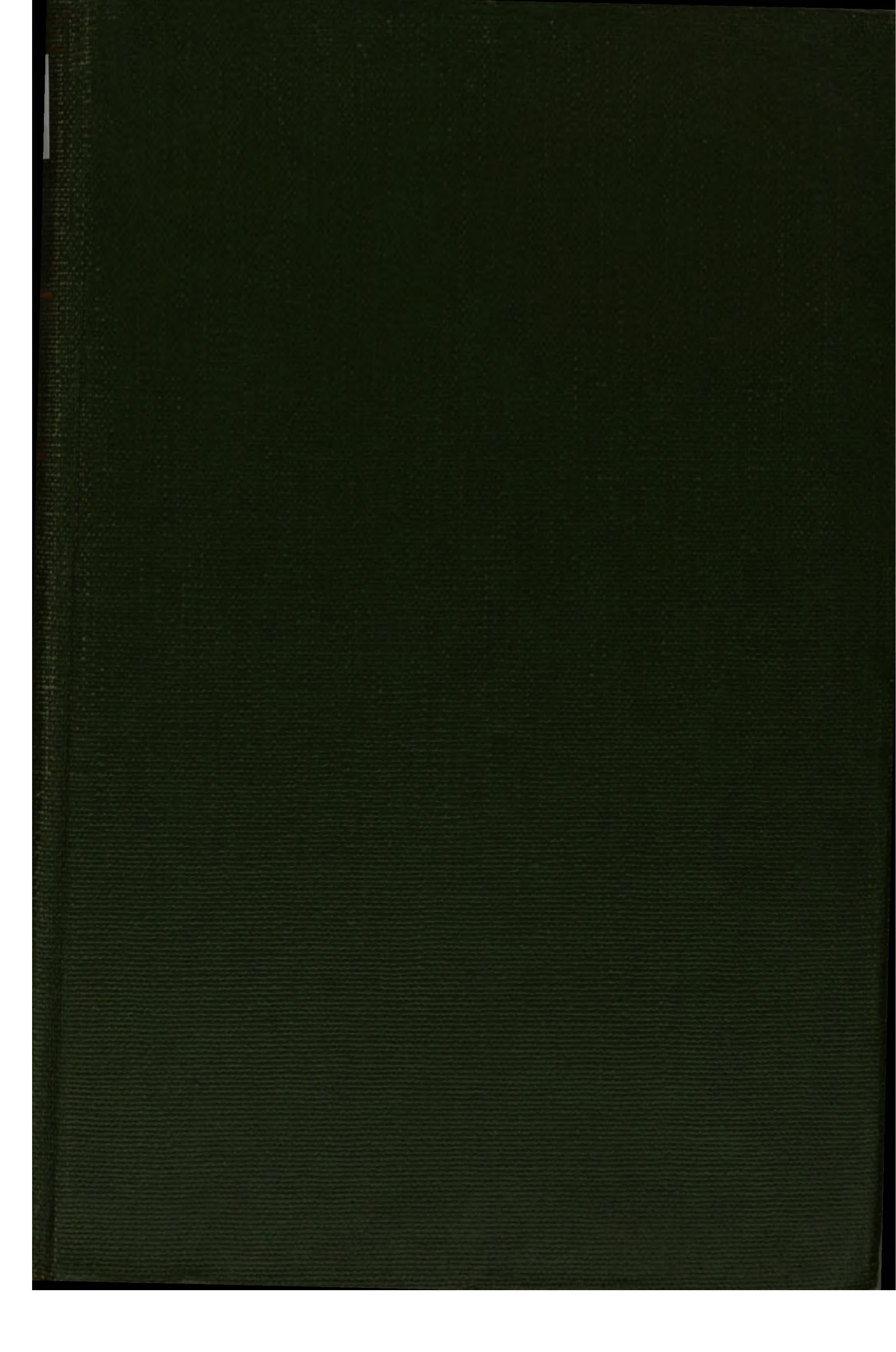




UNIVERSITY OF CALIFORNIA
MEDICAL CENTER LIBRARY
SAN FRANCISCO
SIGILLVM · VNIVERSITATIS · CALIFORNIENSIS
FIAT LVX
MDCCCLXVIII
EX LIBRIS

15 - 158

Biochemische Zeitschrift

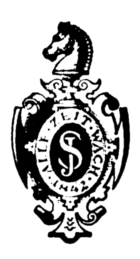
Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

157

Hundertsiebenundfünfzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1925

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhalt.

Über Rotenon, ein wirksamer Bestandteil der Derriswurzel (Derris elliptica Benth.).

Von

Sankichi Takei.

(Aus dem agrikulturchemischen Institut der Universität Tokio.)

(Eingegangen am 13. Januar 1925.)

Einleitung.

Die neuerdings in Japan als Insektizid eingeführte Tuba- oder Derriswurzel ist seit langen Zeiten im tropischen Asien als Toeba oder Ackertuba bekannt. Die Eingeborenen wußten schon längst dieselbe zum Zwecke des Fischfangs zu gebrauchen, auch als Insektizid oder als Pfeilgift zu verwenden. So ist es wohl begreiflich, daß verschiedene Forscher seit längerer Zeit ihre Aufmerksamkeit darauf gerichtet haben. Wir finden z. B. in den Arbeiten von *Nagai* und *Ishikawa* die morphologische Beschreibung dieser Pflanze sowie physiologische Studien über den Giftstoff derselben. *Mc Indoo*, *Sivers* und *Abott* haben auch über die insektizide Wirkung derselben berichtet. Viele bemühten sich auch, den wirksamen Stoff rein darzustellen und dessen chemische Natur aufzuklären. Trotzdem gehen die bisherigen Ergebnisse weit auseinander. So haben wir bis jetzt noch keinen Anhaltspunkt über die chemische Konstitution dieser Substanz. Die abweichenden Resultate verschiedener Forscher hängen teilweise von dem Rohmaterial ab, weil es viele Varietäten von Derris gibt. Es ist auch möglich, daß die Qualität sowie Quantitat des Giftstoffs vom Klima und Boden beeinflußt werden. Ich will aber nicht auf solche Einzelheiten eingehen und möchte nur einige Auszüge über die chemischen Arbeiten, die bisher in dieser Richtung gemacht wurden, erwähnen.

1. *M. Greschoff*[1]) hat aus Derris elliptica Benth. einen Giftstoff in amorphem Zustande isoliert und ihm den Namen „Derrid" gegeben. Nach

[1]) *M. Greschoff*, Ber. **23**, 3538, 1890.

ihm enthielt diese Substanz keinen Stickstoff und gehörte nicht zu den Glucosiden, sie war in Alkohol, Äther und Chloroform leicht, in Wasser aber schwer löslich, sie schmolz bei 60° und zersetzte sich bei etwa 160°. Die alkoholische Lösung reagierte schwach sauer. Durch Schmelzen mit Kali wurden Salicylsäure und Protocatechusäure erhalten.

2. *Sillevoldt*[1]) hat auch das *Greschoff*sche „Derrid" isoliert. Es war ein gelbes, amorphes Pulver vom Schmelzpunkt 73°, das *Fehling*sche Lösung nicht reduzierte und drei Methoxylgruppen enthielt. Er gab ihm die empirische Formel $C_{33}H_{30}O_{10}$. Ferner konnte er noch eine Substanz von der Formel $C_{33}H_{28}O_9$ in Gestalt gelber Nadeln isolieren, die bei 210 bis 214° schmolzen. Dieser Körper wurde von ihm „Anhydroderrid" genannt. *Sillevoldt* nahm zwar das Vorhandensein zweier Hydroxylgruppen im Derrid an, er konnte jedoch kein Acetyl- oder Benzoylderivat desselben erhalten. Die Gewinnung eines Phenylhydrazons gelang gleichfalls nicht.

3. *B. Power*[2]) konnte aus den Wurzeln von Derris uliginosa Benth. den Giftstoff nicht kristallinisch erhalten. Er isolierte aber das *Sillevoldt*sche „Anhydroderrid" in Gestalt gelber Kristalle. Ferner hat er die Spaltungsprodukte der harzartigen Substanz untersucht und behauptete, daß der Giftstoff in der chloroformlöslichen Harzsubstanz enthalten ist.

4. *W. Lenz*[3]) hat die Wurzel von Derris elliptica Benth. mit Petroläther, Äther, Alkohol und Wasser usw. sukzessiv extrahiert; aus dem heißen Benzolextrakt hat er eine kristallinische Substanz vom Schmelzpunkt 158° isoliert, die er „Derrin" nannte.

5. *E. H. van Hasselt*[4]) hat über die physiologische Funktion von Derrid berichtet.

6. *Kazuo Nagai*[5]) hat aus der Wurzel von Derris chinensis Benth. farblose tafelförmige Kristalle isoliert und ihnen den Namen „Rotenon" gegeben. Der Schmelzpunkt derselben war 163°. Sie waren in organischen Lösungsmitteln löslich, nicht aber in Wasser und enthielten keinen Stickstoff. Die alkoholische Lösung reagierte neutral. Nach der Elementaranalyse wurde dem Stoffe die empirische Formel $C_{18}H_{16}O_5$ gegeben. Die Molekulargewichtsbestimmung unterstützte auch die Richtigkeit dieser Formel. Weiter hat er das Phenylhydrazon des Rotenons ($C_{18}H_{16}O_4.C_6H_6N_2$) vom Schmelzpunkt 243° dargestellt.

7. *Takeo Ishikawa*[6]) isolierte auch aus der Wurzel von Derris elliptica Benth. einen Giftstoff in Form farbloser tafelförmiger Kristalle. Er nannte diesen Körper „Tubotoxin". Der Schmelzpunkt war 163,5°. Er löste sich in organischen Lösungsmitteln, nicht aber in Wasser und enthielt keinen Stickstoff. Die alkoholische Lösung reagierte neutral. Das spezifische Drehungsvermögen in Benzollösung war $[\alpha]_D^{29,5^0} = -225,2^0$. Nach der Analyse stimmte die empirische Formel mit $C_{18}H_{18}O_5$, was durch die Molekulargewichtsbestimmung bestätigt wurde. Er hat ferner das *Sille-*

[1]) *Sillevoldt*, Arch. f. Pharm. **237**, 595, 1899; Nederl. Tijdschr. f. Pharm. **11**, 245—256.
[2]) *B. Power*, Pharm. Arch. **5**, 145—146, 1902; **6**, 1—4, 1906.
[3]) *W. Lenz*, ebendaselbst **249**, 298—305, 1911.
[4]) *E. H. van Hasselt*, Chem. Centralbl. **1911**, I, 247.
[5]) *Kazuo Nagai*, Journ. Chem. Soc. Tokio **23**, 740, 1902.
[6]) *Takeo Ishikawa*, Journ. med. Ges. Tokio **31**, Nr. 4, 1917.

woldtsche „Anhydroderrid“ isoliert. Nach ihm soll sich das Tubotoxin gegen Eisessig und konzentrierte Schwefelsäure anders verhalten als Rotenon.

8. *Tatsuo Kariyone* und *Kenji Atsumi*[1]) isolierten aus Derris elliptica Benth. eine Substanz, die mit dem Tubotoxin von *Ishikawa* vollkommen identisch war. Die empirische Formel war $C_{18}H_{18}O_5$. Die alkoholische Lösung reduzierte *Fehling*sche Lösung sowie ammoniakalische Silbernitratlösung beim Erwärmen. Es wurden ferner das Phenylhydrazon, $C_{18}H_{18}O_4 . C_6H_6N_2$ (Schmelzpunkt 255°), und das Monoxim, $C_{17}H_{18}O_4(C:NOH)$ (Schmelzpunkt 245°), dargestellt, so daß das Vorhandensein einer Carbonylgruppe in diesem Körper festgestellt wurde. Sie haben auch durch Acetylierung noch eine Substanz dargestellt, die wahrscheinlich das Diacetylderivat des Tubotoxins war. Sie schmolz unscharf bei 125 bis 155°. Es müssen deshalb zwei Hydroxylgruppen in einem Molekül des Tubotoxins existieren. Die Methoxylzahlbestimmung stimmte merkwürdigerweise weder mit einer noch mit zwei Methoxylgruppen, sondern ergab nur 1½ Methoxylgruppen in einem Molekül.

Aus oben erwähnten Ergebnissen sieht man, daß das Rotenon von *Nagai* mit dem Tubotoxin von *Ishikawa* identisch ist. Das Vorkommen einer Carbonylgruppe in diesem Körper ist kaum zu bezweifeln. Die Methoxylgruppe ist auch sicher vorhanden, aber die Existenz von zwei Hydroxylgruppen bedarf weiterer Bestätigung. Die von *Greschoff* berichtete Entstehung von Salicylsäure und Protocatechusäure durch Kalischmelze hat bis jetzt noch keine Bestätigung gefunden.

Eigene Versuche des Verfassers.

Der Verfasser hat auch aus der Wurzel von Derris elliptica Benth. durch Extraktion mit Äther oder Alkohol den wirksamen Bestandteil vom Schmelzpunkt 163° kristallinisch erhalten und konnte bestätigen, daß er mit dem Tubotoxin von *Ishikawa* identisch war. Die Ausbeute an reinem Produkt betrug 1,5 bis 6 Proz. des Rohmaterials. Es kristallisierte als farblose, sechsseitige Tafeln oder Nadeln und hatte keinen Geruch und Geschmack. Die Substanz war in organischen Lösungsmitteln löslich, aber nicht in Wasser und verdünnter Säure. In kaltem Alkali löste sie sich nicht, beim Erwärmen löste sie sich teilweise mit gelber Färbung. Sie enthielt keinen Stickstoff. Die alkoholische Lösung reduzierte *Fehling*sche Lösung sowie ammoniakalische Silberlösung.

Über die Toxizität dieser Substanz für weiße Ratten wurde festgestellt, daß bei subkutaner Injektion 0,00125 g für 100 g Körpergewicht die minimale Letaldosis ist.

---

[1]) *Tatsuo Kariyone* und *Kenji Atsumi*, Journ. f. Pharm. 1923, S. 491.

Die Analyse stimmte besser mit der Formel $C_{19}H_{18}O_5$, so muß die von *Ishikawa* vorgeschlagene Formel $C_{18}H_{18}O_5$ aufgegeben werden. Das Phenylhydrazon des Rotenons schmolz bei 243 bis 245°, stimmte also mit der Angabe von *Nagai* überein. Die Methoxylzahlbestimmung bestätigte die Beobachtung von *Kariyone*, daß 1½ Methyoxlgruppen in 1 Molekül Rotenon vorhanden sind. Ob dies ein Beobachtungsfehler ist, muß später untersucht werden.

Durch Einwirkung von konzentrierter Schwefelsäure auf Rotenon wurden farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 177 bis 178° erhalten. Sie enthielten keinen Stickstoff und die Analyse stimmte mit der Formel $C_{19}H_{18}O_5$. Die Methoxylzahl war 1½. Es handelt sich also um ein Isomeres des Rotenons. Es zeigte keine Toxizität für weiße Ratten.

Beim Verseifen des Rotenons mit alkoholischem Kali wurden farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 128 bis 129° erhalten. Die Formel derselben war $C_{10}H_{10}O_3$ (?). Die wässerige oder alkoholische Lösung reagierte auf Lackmus sauer, und 1 Molekül derselben brauchte 1 Molekül Alkali zum Neutralisieren. Es lag also eine Monocarbonsäure vor. Sie gibt mit $FeCl_3$ eine violette Färbung, absorbiert Brom aus ätherischer Lösung und enthält keine Methoxylgruppe. So kann man annehmen, daß dieser Körper eine Phenolcarbonsäure ist, welche eine ungesättigte Seitenkette im Benzolkern besitzt. Aus dieser Substanz wurden wieder durch Kalischmelze farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 182° erhalten. Diese waren in heißem Wasser löslich und reagierten gegen Lackmus sauer. Beim Erhitzen auf 150 bis 160° sublimierten sie und bildeten schöne Nadeln. Die Formel war $C_9H_{10}O_3$. Dieser Substanz gab der Verfasser den Namen „Rotensäure“. Sie gibt eine tiefblaue Färbung mit $FeCl_3$. Das Ca- oder Ba-Salz bildete schöne Tafeln oder Nadeln vom Schmelzpunkt 220 bis 230°. Mit konzentrierter Salpetersäure behandelt, wurde ein Nitrokörper $C_9H_9O_3 . NO_2$ vom Schmelzpunkt 168° als gelbe Nadeln erhalten.

Nach der Literaturangabe hat die Oxy-Mesitylensäure die Formel $C_9H_{10}O_3$, schmilzt bei 180° und gibt eine tiefblaue Färbung mit $FeCl_3$. Sie sublimiert auch und bildet ein Ca- oder Ba-Salz. Alle diese Eigenschaften stimmen mit unserem Präparat überein. Bei der Mischprobe wurde aber der Schmelzpunkt beträchtlich erniedrigt. Sie bildet ferner kein Nitroderivat, also ist sie mit unserem Produkt nicht identisch. Wahrscheinlich handelt es sich um ein Isomeres der Oxy-Mesitylensäure. Unter den Dimethyl-oxy-Benzoesäuren von der Formel $C_9H_{10}O_3$, die mit $FeCl_3$ eine blaue Färbung geben, d. h. die Hydroxylgruppe in Orthostellung zur Carboxylgruppe haben, sind folgende sechs Isomeren

existenzfähig, und von diesen sind drei (I, II, III) schon bekannt, während die anderen drei (IV, V, VI) noch unbekannt sind.

		Schmelzpunkt	Sublimation	Reaktion mit $FeCl_3$
I.	HOOC, CH_3, HO, CH_3 — Oxy-Mesitylensäure	180°	sublimiert	tief blau
II.	CH_3, HOOC, HO, CH_3	144°	nicht sublimiert	tief blau
III.	HOOC, CH_3, HO, CH_3	199°	sublimiert	tief blau

IV. CH_3, HOOC, CH_3, HO — V. HOOC, HO, CH_3, CH_3 — VI. CH_3, HOOC, HO, CH_3

Von den oben angegebenen sechs Strukturisomeren sind I, II, III mit unserem Präparat nicht identisch. Die Formel IV bildet vielleicht keinen Nitrokörper, weil die Parastelle gegen die OH-Gruppe besetzt ist. In V und VI ist die Parastelle frei, so daß die Bildung von Nitroderivaten möglich ist. So vermuten wir, daß unser Körper (Rotensäure) entweder Formel V oder VI entspricht. Synthetische Versuche würden diese Frage entscheiden.

Es ist dem Verfasser gelungen, durch unmittelbare Kalischmelze des Rotenons auch dieselbe Substanz (Rotensäure) von der Formel $C_9H_{10}O_3$ zu gewinnen. Wird Rotenon bei Luftabschluß (unter Durchleitung eines Wasserstoffstroms) mit alkoholischem Kali erhitzt, so entstehen in Äther schwer lösliche nadelförmige Kristalle, die, aus heißem Benzol umkristallisiert, bei 209 bis 210° schmelzen. Sie sind in Benzol und Chloroform leicht, in Äther und Alkohol schwer und in Wasser nicht löslich. Sie lösen sich in heißem Eisessig mit grüner Färbung, reagieren gegen Lackmus neutral und reduzieren ammoniakalische Silberlösung. Die Analyse dieser Substanz entspricht der Formel $C_{19}H_{18}O_6$. Sie ist also ein Isomeres des Rotenons. Sie hat keine Giftwirkung auf weiße Ratten. Durch Einwirkung von Ozon auf Rotenon entstand ein sehr unbeständiges Peroxyd, das sich beim Trocknen von selbst entzündete. Kochte man diesen Körper mit Wasser, so bildete sich schließlich Oxalsäure und es entstand kein bestimmtes Zwischenprodukt.

Es wurden verschiedene Acetylierungsmethoden ausprobiert, um die Hydroxylgruppe im Rotenon nachzuweisen. Es wurde aber kein positives Resultat erzielt. Beim Erhitzen des Rotenons mit Essigsäureanhydrid im Einschlußrohr wurde zwar eine Substanz von der Formel $C_{18}H_{16}O_5$ als gelbe Nadeln erhalten. Der Schmelzpunkt war 232 bis 233°. Sie erwies sich jedoch als kein Acetylkörper.

Weiter wurde versucht, das Rotenon zu methylieren. Durch Einwirkung von Diazomethan wurde eine eigenartige Substanz vom Schmelzpunkt 116 bis 118° als weißes amorphes Pulver erhalten. Sie gab aber keine Methoxylzahl, obgleich sie mit Jodwasserstoff vom spezifischen Gewicht 1,7 bei 140° erhitzt wurde. So hat wahrscheinlich keine Methylierung stattgefunden.

Der Verfasser nimmt deshalb an, daß die Bildung der Acetyl- oder Methylderivate durch irgend eine Ursache verhindert sein muß, falls die Hydroxylgruppe überhaupt im Rotenon vorhanden ist.

Wird Rotenon in essigsaurer Lösung mit Chromsäure bei 40 bis 50° behandelt, so entstehen gelbe Nadeln von der Formel $C_{18}H_{16}O_5$. Sie schmelzen bei 232 bis 233°. Sie lösten sich in Alkohol, Eisessig usw. Die alkoholische Lösung reagierte neutral und reduzierte ammoniakalische Silberlösung beim Erwärmen. Die Kristalle lösten sich in alkoholischem Kali mit rötlichgelber Färbung. Sie lösten sich auch in konzentrierter H_2SO_4 mit rötlichgelber Färbung. Sie waren mit der Substanz, die durch Essigsäureanhydrid aus Rotenon erhalten wurde, identisch. Bei Mischprobe derselben wurde der Schmelzpunkt nicht geändert.

Wird Rotenon in essigsaurer Lösung mit Chromsäure erhitzt, so erhält man gelbe Nadeln von der Formel $C_{17}H_{14}O_5$. Der Schmelzpunkt war 298°. Dieser Substanz gab der Verfasser den Namen Rotenonon. Sie war in Alkohol und Essigsäure löslich. Die alkoholische Lösung reagierte neutral und reduzierte ammoniakalische Silberlösung beim Erwärmen, reduzierte aber *Fehling*sche Lösung nicht. Die Substanz sublimierte gegen 260°. In Alkali löste sie sich mit gelblichroter Färbung. Sie löste sich auch in Schwefelsäure mit roter Färbung. Die Methoxylzahl stimmte weder mit Mono-, noch mit Dimethoxylkörpern.

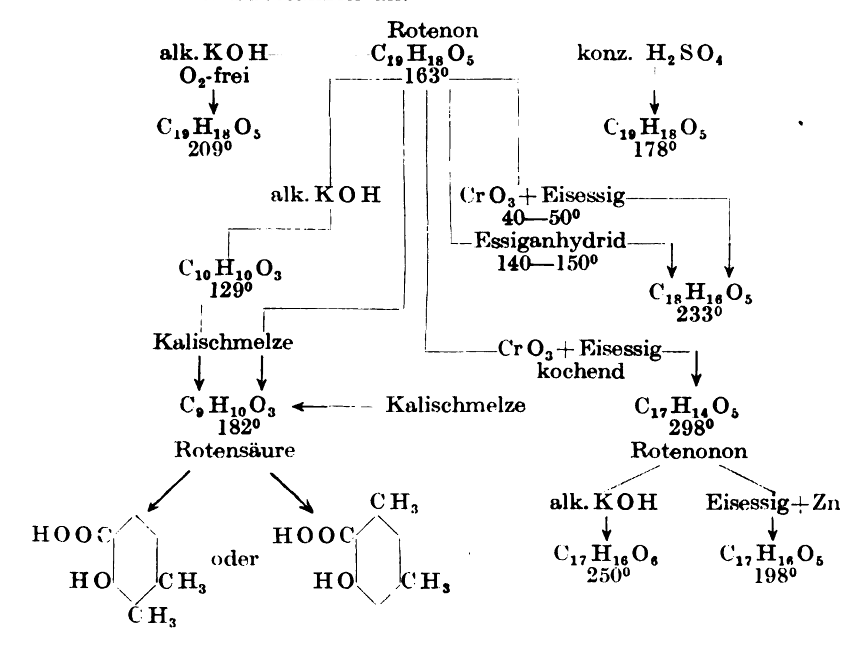
Mit alkoholischem Kali verseift, lieferte Rotenonon farblose Prismen von der Formel $C_{17}H_{16}O_6$ mit dem Schmelzpunkt 250°. Sie waren in Alkohol und Äther leicht löslich, reagierten auf Lackmus sauer und reduzierten ammoniakalische Silberlösung nicht. Sie gaben tiefrote Färbung mit $FeCl_3$. Es ist sehr wahrscheinlich, daß durch Verseifung des Rotenonons eine Oxysäure gebildet wird, was bedeutet, daß Rotenonon einen Lactonring hat. Im Rotenon selbst muß die Carbonylgruppe in Lactonform existieren.

Bei der Kalischmelze des Rotenonons wurde eine Dimethyl-o-Oxybenzoesäure vom Schmelzpunkt 182° erhalten. Diese Säure wurde

vom Verfasser Rotensäure genannt. Sie wurde auch durch Kalischmelze des Rotenons gebildet.

Wenn Rotenonon mit Eisessig und Zink reduziert wird, so entstehen farblose Nadeln von der Formel $C_{17}H_{16}O_5$. Der Schmelzpunkt war 198°. Sie waren leicht oxydabel.

Das Ergebnis aus Obenerwähntem ist im folgenden Schema klar zu ersehen. Die Ziffern unter den Formeln zeigen den Schmelzpunkt der betreffenden Substanzen an.



Experimenteller Teil.

1. Darstellung des Rotenons.

300 g lufttrockenes Pulver von Derriswurzeln wurden im *Soxhlet*schen Apparat 8 bis 12 Stunden mit Äther extrahiert. Schon während der Extraktion begann die Kristallisation des Rotenons am Rande des Gefäßes, und nach dem Erkalten schieden sich die Kristalle fast vollständig aus. Die Ausbeute an Rohkristallen betrug 20 g. Nach einmaligem Umkristallisieren aus Alkohol wog das Produkt 18 g, d. h. 6 Proz. des Rohmaterials. Man kann auf diese Weise den Gehalt des Rohmaterials an Rotenon annähernd quantitativ ermitteln.

2. Giftwirkung auf weiße Ratten.

Es wurde zuerst vergebens versucht, den weißen Ratten das Rotenon per os zu geben. Schon wenn geringe Mengen desselben dem Futtermittel beigemengt wurden, verweigerten die Tiere die Nahrungs-

aufnahme. Die weißen Ratten scheinen eine große Abneigung gegen diesen Giftstoff zu haben; es war daher subkutane Injektion erforderlich. Zu diesem Zwecke wurden 0,1 g Rotenon in 20 g Olivenöl gelöst und nach der Injektion bestimmter Mengen wurden die Vergiftungssymptome sowie die Lebensdauer des Tieres beobachtet. Es wurde gefunden:

0,0025 g Rotenon auf 100 g Körpergewicht eingespritzt: das Tier starb nach 16 Stunden; mit 0,00125 g starb es nach 26 Stunden; die Hälfte der letzteren Dosis reichte aber nicht aus, das Tier zu töten. So scheinen 0,00125 g beinahe die minimale letale Dosis zu sein.

3. Analyse des Rotenons.

Die Rohkristalle wurden zweimal aus heißem Alkohol umkristallisiert. Die farblosen Tafeln oder Nadeln schmolzen konstant bei 163°. Sie wurden im Vakuum bei 100° getrocknet und analysiert:

Substanz g	CO_2 g	H_2O g	C Proz.	H Proz.
0,1863	0,4797	0,0914	70,02	5,45
0,1873	0,4687	0,0901	69,96	5,47
0,1962	0,4995	0,0986	69,78	5,89
0,1795	0,4570	0,0870	69,47	5,37
0,1905	0,4885	0,0940	69,93	5,48
0,1505	0,3837	0,0721	69,45	5,36
0,1751	0,4500	0,0869	70,08	5,51
Berechnet für $C_{19}H_{18}O_5$			69,93	5,52
„ „ $C_{18}H_{18}O_5$			68,78	5,73

Die Analyse stimmt also besser mit $C_{19}H_{18}O_5$. Die von *Ishikawa* vorgeschlagene Formel $C_{18}H_{18}O_5$ muß deshalb aufgegeben werden.

4. Molekulargewichtsbestimmung.

Zur Bestimmung des Molekulargewichts wurde das Rotenon in Benzol gelöst und die Erniedrigung des Gefrierpunkts nach der kryoskopischen Methode ermittelt:

Substanz g	Benzol g	Erniedrigung des Gefrierpunktes	Mol.-Gewicht
0,1295	21,9	0,090	327,4
0,1079	21,9	0,075	328,4
Berechnet für $C_{19}H_{18}O_5$			326,0

5. Phenylhydrazon des Rotenons.

5 g Rotenon wurden mit 7,5 g salzsaurem Phenylhydrazin, 4,2 g Natriumacetat und 40 g Alkohol 4 Stunden am Rückflußkühler erhitzt. Das Reaktionsprodukt schied sich in Gestalt gelber Nadeln aus. Sie wurden abgesaugt, mit Wasser gewaschen und aus Äther oder Benzol umkristallisiert. Aus heißem Benzol schieden sich die Kristalle zuerst als weiße Nadeln aus: sie enthielten noch Benzol in ihrem Molekül.

Beim Trocknen im Exsikkator verloren sie das Kristallbenzol und die Farbe ging in Gelb über. Ausbeute 15 g. Der Schmelzpunkt war 243 bis 245°. Er war also etwas niedriger als die Angabe von *Kariyone*, stimmte aber mit derjenigen *Nagais* gut überein.

Stickstoffbestimmung des Phenylhydrazons:

Substanz g	N ccm	Atm. Druck	Temperatur	N Proz.
0,1718	9,0	762,5	19°	6,01
0,2030	10,7	754,5	17	5,97
Berechnet für $C_{19}H_{18}O_4C_6H_6N_2$				6,73

6. Methoxylzahl des Rotenons.

Die Methoxylzahl wurde nach der *Zeisel*schen, von *Perkin* modifizierten Methode ermittelt:

Substanz g	Ag I g	Methoxylzahl Proz.
0,3082	0,3537	15,17
0,2220	0,2605	15,48
0,2560	0,3057	15,72
0,3376	0,3932	15,37
Berechnet für $C_{18}H_{15}O_4(OCH_3)$ . . .		9,50
„ „ $C_{17}H_{12}O_3(OCH_3)_2$ . . .		19,01

Die beobachteten Zahlen stimmten also weder mit der Mono-, noch mit der Dimethoxylverbindung, sie fielen gerade dazwischen. Diese Tatsache stimmt mit der Beobachtung von *Kariyone* überein.

7. Einwirkung der konzentrierten Schwefelsäure auf Rotenon.

Wird Rotenon in einer kleinen Menge konzentrierter Schwefelsäure gelöst und die rötlich gefärbte Lösung mit viel Wasser verdünnt, so entsteht ein weißer flockiger Niederschlag. Schüttelt man nun mit Äther und löst, nach dem Verdampfen des Äthers, den Rückstand aus heißem Alkohol um, so erhält man schöne Nadeln vom Schmelzpunkt 177 bis 178°, die in organischen Lösungsmitteln leicht, aber in Wasser nicht löslich sind. Sie reduzieren die *Fehling*sche Lösung sowie die ammoniakalische Silberlösung. Die Analyse dieser Substanz gab folgendes Resultat:

Substanz g	CO_2 g	H_2O g	C Proz.	H Proz.
0,2352	0,6015	0,1180	69,82	5,57
0,1557	0,4016	0,0773	70,14	5,51
0,1911	0,4924	0,0940	70,03	5,46
0,1652	0,4248	0,0843	70,12	5,67
Berechnet für $C_{19}H_{18}O_5$			69,93	5,52

Die Analyse stimmt mit dem unveränderten Rotenon.

Die Methoxylzahlbestimmung gab folgendes Resultat:

Substanz g	Ag I g	Methyloxylzahl Proz.
0,1462	0,1735	15,66
Methoxylzahl des Rotenons		15,50

Diese Substanz, in Olivenöl gelöst und weißen Ratten subkutan eingespritzt, zeigte keine Giftwirkung. So handelt es sich um ein Isomeres des Rotenons.

8. Verseifung des Rotenons.

10 g Rotenon wurden mit 200 ccm alkoholischem Kali am Rückflußkühler 3 bis 4 Stunden erhitzt. Nach dem Erkalten wurde die rötlich braune Flüssigkeit mit Wasser stark verdünnt und mit Äther wiederholt geschüttelt. Die wässerige Lösung wurde jetzt mit Schwefelsäure angesäuert und abermals mit Äther geschüttelt. Die ätherische Lösung wurde mit Wasser gewaschen, mit Natriumsulfat entwässert und abgedampft. Die dabei zurückgebliebene harzartige Masse wurde am Rückflußkühler mehrere Stunden mit Petroläther extrahiert. Der größte Teil des Harzes blieb dabei noch ungelöst und der Petroläther war beinahe farblos, trotzdem hinterblieben beim Abdampfen des letzteren 0,5 g farblose Nadeln, welche, aus Wasser umkristallisiert, bei 129° schmolzen. Die wässerige Lösung dieser Substanz reagierte sauer und gab eine violette Färbung mit $FeCl_3$. Brom in ätherischer Lösung wurde in einigen Stunden entfärbt. Die Methoxylgruppe wurde nicht nachgewiesen.

Analyse dieser Substanz:

Substanz g	CO_2 g	H_2O g	C Proz.	H Proz.
0,1015	0,2521	0,0516	67,73	5,64
0,1939	0,4802	0,0966	67,54	5,53
Berechnet für $C_{10}H_{10}O_3$			67,46	5,61

Für die Aciditätsbestimmung wurden 0,050 g Substanz in 100 ccm gelöst und mit n/20 Kalilauge titriert (Phenolphthalein als Indikator):

Substanz ccm	Substanz g	KOH-Lösung verbraucht ccm	KOH verbraucht g
10	0,005	0,5	0,0014
20	0,010	0,95	0,0027
10	0,005	0,5	0,0014
Durchschnitt .	0,005	0,5	0,0014
Berechnet für $C_{10}H_{10}O_3$ als Mono-carbon-säure	0,005		0,0015

Obgleich der Beobachtungsfehler ziemlich groß ist, so gibt es doch keinen Zweifel, daß 1 Molekül Substanz ($C_{10}H_{10}O_3$) mit 1 Molekül KOH neutralisiert wird. Die Substanz $C_{10}H_{10}O_3$ muß deshalb als eine Monocarbonsäure betrachtet werden. Wenn die Verseifungsflüssigkeit ohne vorherige Neutralisation mit Äther geschüttelt und die ätherische Lösung abgedampft wurde, so hinterließ sie eine harzartige Masse, die später näher untersucht werden soll.

9. Kalischmelze des Rotenons.

Zu diesem Zwecke wurde das Rotenon mit der dreifachen Menge KOH (in Stangen) im Nickeltiegel bei 180 bis 220° geschmolzen. Die dadurch entstandene harzige Masse wurde in Wasser gelöst und nach dem Ansäuern mit Äther geschüttelt. Der größte Teil der Schmelze ging dabei in die ätherische Lösung über. Diese Lösung wurde nach dem Waschen mit Wasser mit Natriumsulfat entwässert und eingedampft. Der Rückstand wurde nun mit Petroläther extrahiert. Beim Vertreiben des Lösungsmittels schieden sich nadelförmige Kristalle aus. Dieselben Kristalle wurden auch bei der Dampfdestillation der harzartigen Masse erhalten. Aus heißem wässerigen Alkohol oder wässerigem Aceton umkristallisiert, schieden sich die Kristalle als farblose Nadeln aus. Sie fingen bei 160° allmählich an zu sublimieren und schmolzen bei 182°. Sie sind in Wasser schwer, in Alkohol und Aceton aber leichter löslich. Die alkoholische Lösung reagiert sauer und gibt eine tiefblaue Färbung mit $FeCl_3$. Man erhält dieselbe Substanz auch durch Kalischmelze des Verseifungsprodukts ($C_{10}H_{10}O_3$) des Rotenons vom Schmelzpunkt 129°.

Analyse dieser Substanz:

Substanz g	CO_2 g	H_2O g	C Proz.	H Proz.
0,1590	0,3812	0,0776	65,38	5,42
0,1882	0,4495	0,0930	65,15	5,49
Berechnet für $C_6H_6O_2$			65,45	5,45
„ „ $C_9H_{10}O_3$			65,05	6,02

Es wurde eine Nitroverbindung dieser Substanz dargestellt, indem sie in Aceton gelöst und mit konzentrierter Salpetersäure tropfenweise versetzt wurde. Die gelbe Flüssigkeit wurde mit Wasser verdünnt. Es entstand dadurch ein amorpher Niederschlag des nitrierten Produkts, welcher in Äther gelöst und nach dem Verdampfen des Äthers aus heißem Alkohol umkristallisiert wurde. Es resultierten schöne gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 168°.

Stickstoffbestimmung des Nitrokörpers.

Substanz g	N ccm	Atm. Druck	Temperatur	N Proz.
0,0606	3,4	768,1	15°	6,59
Berechnet für $C_9H_9O_3NO_2$				6,63
„ „ $C_9H_8O_3(NO_2)_2$				10,98

Die Analyse stimmt mit dem Mono-Nitroderivat des $C_9H_{10}O_3$.

Aus obenerwähnten Resultaten sieht man, daß die vom Verfasser erhaltene Substanz der empirischen Formel $C_9H_{10}O_3$ entspricht. Es wurde ferner gefunden, daß diese Substanz mit Dimethyl-o-Oxybenzoesäure (Oxy-Mesitylensäure), $C_9H_{10}O_3$, große Ähnlichkeit hat. Höchstwahrscheinlich ist sie ein Isomeres der Oxy-Mesitylensäure.

Obgleich die Analyse dieser Substanz auch mit $C_6H_6O_2$ ziemlich gut stimmt, so zeigen doch die drei Isomeren von der Formel $C_6H_6O_2$, Brenzcatechin, Resorcin und Hydrochinon, ganz andere Schmelzpunkte. In anderen Eigenschaften waren sie auch von unserer Substanz ganz verschieden.

Es wurden ferner die Calcium- und Bariumsalze dieser Substanz dargestellt, indem sie mit Calcium- oder Bariumcarbonat gekocht und abfiltriert wurden. Beim Stehen schieden sich aus der klaren Flüssigkeit nadel- oder tafelförmige Kristalle des Calcium- bzw. Bariumsalzes aus, die bei 210 bzw. 220° zu einer schwarzen Masse schmolzen.

10. Verseifung des Rotenons bei Luftabschluß.

Um die Verseifung des Rotenons bei Luftabschluß auszuführen, wurde während des Erhitzens ein Wasserstoffstrom durchgeleitet. Nach einigen Stunden wurde das Reaktionsprodukt ebenso behandelt, wie oben beschrieben ist, und man erhielt in Äther schwer lösliche Nadeln vom Schmelzpunkt 209 bis 210°, welche in Wasser und Alkohol schwer, in Chloroform, Schwefelkohlenstoff oder in Benzol löslich waren. Sie lösten sich in heißem Eisessig mit grüner Färbung.

Analyse dieser Substanz:

Substanz g	CO_2 g	H_2O g	C Proz.	H Proz.
0,2138	0,5475	0,1050	69,83	5,45
Berechnet für $C_{19}H_{18}O_5$			69,93	5,52

Es war ein Isomeres des Rotenons und zeigte keine Giftwirkung auf weiße Ratten.

11. Einwirkung von Diazomethan auf Rotenon.

Wenn man 0,5 g Rotenon und 20 ccm Äther in einer Druckflasche mit einer ätherischen Lösung von Diazomethan, die aus 3 ccm Nitrosomethylurethan erhalten wurde, bei Zimmertemperatur zwei Wochen stehen läßt oder 4 Stunden bei 80° erhitzt, so entsteht ein flockiger Niederschlag, welcher, vom Äther abfiltriert, ein weißes Pulver bildet. Es löst sich in heißem Toluol und scheidet sich beim Erkalten wieder als ein flockiger Niederschlag aus, ohne kristallinisch zu werden. Der Schmelzpunkt war 116 bis 118°. Da die Substanz, mit HI (spezifisches Gewicht 1,7) allein oder mit Essigsäureanhydrid bei 140° erhitzt, keine Reaktion gab, so handelt es sich um kein Methylierungsprodukt.

12. Einwirkung von Essigsäureanhydrid auf Rotenon.

5 g Rotenon wurden mit 20 g Essigsäureanhydrid im Einschlußrohr bei 140 bis 150° 2 Stunden erhitzt. Nach dem Erkalten schieden sich gelbe Nadeln aus, die, aus Eisessig umkristallisiert, bei 232 bis 233° schmolzen. Ausbeute 1,5 g. Sie wurden im Vakuum bei 100° getrocknet und analysiert.

Substanz g	CO_2 g	H_2O g	C Proz.	H Proz.
0,156	0,3985	0,0689	69,35	4,88
Berechnet für $C_{18}H_{16}O_5$			69,23	5,12

Methoxylbestimmung:

Substanz g	AgI g	Methoxylzahl Proz.
0,3380	0,3990	15,58
Berechnet für $C_{17}H_{13}O_4(OCH_3)$		9,80
„ „ $C_{16}H_{10}O_3(OCH_3)_2$ . . .		19,60

13. Oxydation des Rotenons mit Chromsäure (bei niederer Temperatur).

5 g Rotenon wurden in 150 ccm Eisessig gelöst und bei 40 bis 50° mit einer Lösung von 10 g Chromsäure in 300 ccm Eisessiglösung tropfenweise unter Umrühren versetzt. Die Operation dauerte 4 Stunden. Durch Zusatz von viel Wasser entstand ein gelber Niederschlag, welcher abgesaugt und nach dem Trocknen wieder aus heißem Eisessig oder aus Alkohol umkristallisiert wurde. Die feinen gelben Nadeln hatten die Formel $C_{18}H_{16}O_5$ und schmolzen bei 233°. Diese Substanz war mit derjenigen, die durch Einwirkung von Essigsäureanhydrid auf Rotenon erhalten wurde, identisch. Bei Mischprobe derselben blieb der Schmelzpunkt unverändert.

Analyse:

Substanz g	CO_2 g	H_2O g	C Proz.	H Proz.
0,1657	0,4200	0,0755	69,12	5,06
Berechnet für $C_{18}H_{16}O_5$			69,23	5,12

14. Oxydation des Rotenons mit Chromsäure (bei höherer Temperatur).

5 g Rotenon wurden in 150 ccm Eisessig gelöst und kochend mit einer Chromsäure-Eisessiglösung (10 g in 300 ccm) tropfenweise unter Umrühren versetzt. Die Operation dauerte 6 Stunden. Der größte Teil der Essigsäure wurde dann abdestilliert. Beim Erkalten des Rückstands schieden sich gelbe Nadeln aus, die, aus Eisessig umkristallisiert, bei 298^0 schmolzen. Ausbeute 1,5 g.

Analyse:

Substanz g	CO_2 g	H_2O g	C Proz.	H Proz.
0,1335	0,3355	0,0573	68,53	4,76
0,1459	0,3655	0,0642	68,32	4,88
Berechnet für $C_{17}H_{14}O_5$			68,42	4,68

Methoxylbestimmung des Rotenonons.

Mit HI (spezifisches Gewicht 1,7) allein bei 140^0 erhitzt, gab Rotenonon keine Reaktion. Nach Zusatz von Essigsäureanhydrid ergaben sich folgende Zahlen:

Substanz g	Ag I g	Methoxylzahl Proz.
0,2245	0,2740	16,11
Berechnet für $C_{16}H_{11}O_4(OCH_3)$ . . .		10,26
„ „ $C_{15}H_8O_3(OCH_3)_2$ . . .		20,52

Die Zahl stimmte abermals weder mit der Mono- noch mit der Dimethoxylverbindung.

15. Verseifung des Rotenonons.

5 g Rotenonon wurden mit 300 ccm 5proz. alkoholischem Kali 4 bis 5 Stunden auf dem Wasserbad erhitzt. Nach dem Abdestillieren des Alkohols wurde mit Wasser verdünnt und mit Salzsäure angesäuert. Der dabei ausgeschiedene Niederschlag wurde in Äther aufgenommen. Nach dem Verdampfen des Äthers wurde der Rückstand aus heißem Eisessig umkristallisiert. So erhielt man farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 250^0. Ausbeute 2 g.

Analyse:

Substanz g	CO_2 g	H_2O g	C Proz.	H Proz.
0,1827	0,4319	0,0837	64,47	5,08
0,1580	0,3759	0,0730	64,31	5,12
Berechnet für $C_{17}H_{16}O_6$			64,55	5,06

Kalischmelze des Rotenonons.

Rotenonon wurde mit der dreifachen Menge KOH in einem Nickeltiegel im Ölbad erhitzt; bis 200° trat keine merkbare Veränderung ein, bei 230 bis 240° wurde die Masse aber allmählich braunschwarz unter Schaumentwicklung. Die Temperatur wurde bis 250° gesteigert, wo die Reaktion beendet war. Die Schmelze wurde nun in Wasser gelöst, mit Schwefelsäure angesäuert und mit Wasserdampf abdestilliert. So erhielt man farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 182°. Diese Substanz hatte die Formel $C_9H_{10}O_3$ und war mit Rotensäure, die aus Rotenon durch Kalischmelze erhalten wurde, identisch.

16. Reduktion des Rotenonons.

3 g Rotenonon wurden in 200 g Eisessig gelöst und kochend mit 5 g Zinkstaub portionsweise versetzt. Es entwickelte sich dabei lebhaftes Schäumen, und die Lösung entfärbte sich allmählich, bis sie endlich fast farblos wurde. Man filtrierte nun rasch vom Zink ab und verdünnte das Filtrat mit viel Wasser. Der dadurch entstandene flockige Niederschlag wurde abgesaugt und in 30 ccm heißem Eisessig gelöst. Nach dem Erkalten schieden sich farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 198° aus. Ausbeute 1,0 g.

Diese Substanz war leicht oxydabel, so daß ihre alkoholische oder Eisessiglösung bei längerem Erhitzen braun gefärbt wurde.

Für die Analyse wurde sie im Exsikkator über Schwefelsäure 24 Stunden getrocknet.

Substanz g	CO_2 g	H_2O g	C g	H g
0,1629	0,4084	0,0817	68,37	5,57
Berechnet für $C_{17}H_{16}O_5$			68,00	5,33

Untersuchungen über extrahepatogene Gallenfarbstoffbildung an überlebenden Organen.

I. Mitteilung: Untersuchungen an überlebender Milz.

Von

Z. Ernst und **B. Szappanyos.**

(Aus der I. medizinischen Klinik der k. ungarischen Pázmány-Péter-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 17. Januar 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Viele Beobachtungen und Experimente stehen nicht im Einklang mit der Lehre *Naunyns*, nach der sich das Gallenpigment ausschließlich in der Leber bildet. Es ist z. B. die Beobachtung *H. v. d. Berghs* (**1**), daß bei perniziöser Anämie die Milzvene mehr Bilirubin enthält, als die Arterie, schwer anders zu deuten, als daß sich in der Milz Bilirubin bildet. *Leschke* (2), *Guillan-Troisier* (3), *H. v. d. Bergh* haben bewiesen, daß sich auch in serösen Höhlen Bilirubin bilden kann. Die gelbe Farbe des Liquors nach meningealen Blutungen ist auch durch eine lokale Bilirubinbildung bedingt. *Whipple* und *Hooper* (4) konnten bei Hunden, deren untere Körperhälfte und somit auch die Leber aus der Blutzirkulation ausgeschaltet war, durch intravenöse Infusion von hämolysiertem Blute Icterus hervorrufen. Es ist also sehr wahrscheinlich, daß sich Bilirubin auch ohne Mitwirkung der Leber bilden kann. Allerdings ist dies noch immer nicht exakt bewiesen, da eine Mitwirkung der Leber bei den erwähnten Versuchen nicht mit völliger Sicherheit auszuschließen ist. Demgemäß ist die Theorie der extrahepatogenen Bilirubinbildung mit großem Vorbehalt aufgenommen worden. Ein endgültiger Beweis für die extrahepatogene Bilirubinbildung könnte nur dann erbracht werden, wenn es möglich wäre, zu zeigen, daß von der Leber völlig isolierte Organe Bilirubin produzieren können. Dies zu entscheiden, ist die Untersuchung an isolierten überlebenden Organen geeignet. Natürlich ist keine Entscheidung gebracht, wenn Bilirubinbildung auf diese Weise vermißt wird, da überlebende Organe

einzelne ihrer Funktionen einbüßen können. Wenn aber bei einem isolierten überlebenden Organ Bilirubinbildung beobachtet werden kann, so ist das als *direkter Beweis einer extrahepatogenen Bilirubinbildung zu betrachten.*

Wir haben im Jahre 1921 diesbezügliche Versuche ausgeführt. Wie schon damals in einer vorläufigen Mitteilung (5) kurz berichtet wurde, fanden wir, daß die überlebende, mit Blut durchströmte Hundemilz Gallenpigment produziert. Seitdem wurden noch weitere Versuche an überlebender Milz mit demselben Ergebnis ausgeführt. Außerdem führten wir verschiedene Kontrollversuche aus zur Untersuchung der supponierten Versuchsfehler, sowie auch Versuche an anderen überlebenden Organen. In der Folge berichten wir von diesen Versuchen.

Versuchsanordnung.

A. *Allgemeine Beschreibung.* Die Milz wurde isoliert und nach Einführung von Kanülen in die Art. und Vena lienalis mit Blut künstlich durchströmt. Die Isolierung wurde möglichst schnell durchgeführt, damit die Unterbrechung der Blutversorgung nur kurze Zeit dauern soll. Die Durchströmung mit Blut kann auf zweierlei Wegen geschehen. Entweder wird immer frisches Blut durch das Organ geleitet, oder es wird eine künstliche Zirkulation aufrechterhalten. Wir wählten die letztere Methode, weil wir es für unwahrscheinlich hielten, daß schon nach einer einmaligen Durchströmung des Blutes durch die Milz eine Erhöhung der Bilirubinkonzentration im venösen Blute nachweisbar wäre. Bei der Zirkulationsmethode wird das venöse Blut nach Arterialisierung wieder durch die Milz geleitet, und dadurch können wir erreichen, daß der Bilirubingehalt des Blutes durch Kumulation der von der Milz nach und nach abgegebenen kleinen Bilirubinmengen stark ansteigt. Das Durchströmungsblut verdünnten wir in den ersten Versuchen mit Ringerlösung, während wir bei den späteren Versuchen unverdünntes defibriniertes Blut verwendeten. Ein kleiner Teil des zur Durchströmung benutzten Blutes wurde am Anfang des Versuchs hämolysiert. Dies hatte folgenden Zweck: Das Bilirubin wird aus Hämoglobin gebildet. Die Milz kann vielleicht auch das Hämoglobin der roten Blutkörperchen aufarbeiten, wir supponierten aber, daß Bilirubin leichter oder vielleicht in größerer Menge gebildet wird, wenn in dem zur Durchblutung dienenden Blute auch freies Hämoglobin vorhanden sein wird. Letzteres erreichten wir dadurch, daß wir einen Teil des Blutes mit destilliertem Wasser hämolysierten. Nach der Hämolyse isotonisierten wir das Blut durch Zugabe einer entsprechenden Menge zehnfach konzentrierter Ringerlösung.

Der Bilirubingehalt des Blutes wurde am Anfang und am Ende des Versuchs bestimmt, zur Feststellung dessen, ob während des Versuchs Bilirubin produziert wurde oder nicht.

B. *Durchströmungsapparat.* Wir verwendeten den von *Brodie* konstruierten Apparat. Den Apparat beschreiben wir hier nicht, sondern verweisen auf *Fr. Müllers* Beschreibung in Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden **3**, 1. Wir beschreiben nur zwei kleinere, in unseren Versuchen sich als zweckmäßig erwiesene Abänderungen. 1. Die erste bezieht sich auf die Schäumungsvorlage. Bei der Arterialisierung des venösen Blutes durch Sauerstoff entsteht viel Schaum. Dieser wird im ursprünglichen *Brodie*schen Apparat in einer Schäumungsvorlage aufgefangen. Das verschäumte Blut geht natürlich für die Zirkulation verloren. Schon bei langsamem Sauerstoffstrom wird vom Blutreservoir so viel Blut in Schaumform weggeführt, daß die ursprünglich vorhandene Blutmenge schon in 1 bis 2 Stunden sichtbar verringert wird. Um dies zu verhindern, müssen wir die Schäumungsvorlage so anbringen, daß das Blut, welches sich nach Zusammenfallen des Schaumes ansammelt, wieder — möglichst automatisch — in das Blutreservoir zurückfließt. Unsere dies bezweckende Einrichtung war folgende. Als Schäumungsvorlage benutzten wir einen Jenenser Rundkolben von 3 Liter Inhalt, welcher mit der Öffnung nach unten über dem Blutreservoir angebracht war. (Abb. 1). Die Öffnung des Kolbens wurde mit einem dreimal durchbohrten Gummipfropfen verschlossen. In diesem waren drei Glasröhren angebracht, deren zwei zu dem Blutreservoir, eine zum „*Maximumventil*" führte. Der Apparat funktionierte folgendermaßen. Durch das Rohr *d* wurde Sauerstoff in das Reservoir geleitet, und nachdem es durch das Blut perlte, gelangte es mit dem entstandenen Schaum durch das kurze dicke Rohr *a* in die Schäumungsvorlage. Von hier entwich der Sauerstoff durch das Rohr *c* nach dem „*Maximumventil*". Der Schaum blieb im Kolben zurück. Das durch Zusammensintern des Schaumes sich sammelnde Blut floß durch das enge und bis auf den Boden des Reservoirs reichende Rohr *b* in das Reservoir zurück. Mit dieser Einrichtung wurden die durch Wegschäumung verursachten Blutverluste verhindert. 2. Die zweite Abänderung am Apparat war, daß wir in der venösen Leitung einen negativen Druck aufrechterhielten, um den Abfluß des Blutes aus der Milzvene zu erleichtern. Damit wir die Einrichtung zur Erreichung des negativen Druckes kurz beschreiben können, müssen wir auf die schematische Abbildung des *Brodie*schen Apparates in der vorher zitierten Arbeit verweisen (Abderhalden **3**, 1, S. 352, Abb. 107). Auf jener Zeichnung ist das venöse Sammelgefäß mit dem Buchstaben *B* bezeichnet. Zum venösen Sammelgefäß ist ein Bellowrecorder geschaltet. An Stelle dieses Recorders haben wir an unserem Apparat in der auf Abb. 2 sichtbaren Weise ein Wasserventil angewendet. Der Gang der zum Apparat gehörenden Pumpe wurde so reguliert, daß

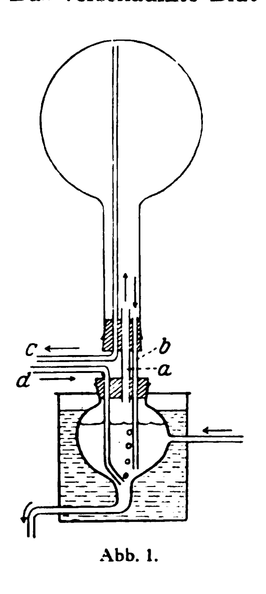


Abb. 1.

dieselbe außer dem zufließenden Blute auch noch Luft absauge. Dadurch entsteht im Sammelgefäß ein negativer Druck, dessen Größe durch das Wasserventil *C* reguliert wird und durch die venöse Leitung eine Saugkraft auf die Milzvene ausübt. In unseren Versuchen hielten wir meistens einen negativen Druck von 5 bis 6 cm Wassersäule aufrecht.

Die Regulierung der Strömungsgeschwindigkeit wurde fortgelassen. Die Strömungsgeschwindigkeit bestimmten wir einfach, indem wir von Zeit zu Zeit die Bluttropfen zählten, die in einer Minute den in die arterielle Leitung eingeschalteten Tropfenzähler durchliefen. Die Tropfengröße wurde vorher ein für allemal bestimmt. Mit Hilfe der Tropfenzahl und -größe konnten wir zu jeder Zeit die Strömungsgeschwindigkeit berechnen. Abgesehen von diesen Einrichtungen, wurde an dem Apparat keine wesentliche Abänderung getroffen.

Die Durchströmung geschah am Anfang des Versuchs unter einem arteriellen Druck von 60 bis 70 mm Hg. Die Strömungsgeschwindigkeit war bei diesem Druck 4 bis 8 ccm pro Minute. Nach 1 bis 2 Stunden stieg die Strömungsgeschwindigkeit allmählich an, wahrscheinlich infolge der Erweiterung der Kapillaren. Nun wurde der arterielle Druck mittels des Maximumventils langsam auf 40, des öfteren sogar auf 30 mm Hg verringert. Dabei blieb die ursprüngliche Strömungsgeschwindigkeit erhalten.

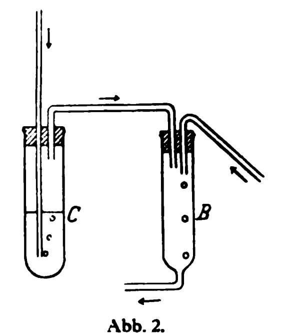


Abb. 2.

C. Als *Versuchstiere* gebrauchten wir Hunde. Der Hund zeigte sich zu diesen Versuchen als besonders passendes Objekt aus folgenden Gründen. Das Hundeblut enthält unter normalen Verhältnissen nie — auch in Spuren kein — Bilirubin (*H. v. d. Bergh*), während das Blut anderer Tiere auch im normalen Zustande oft eine ansehnliche Menge Bilirubin aufweist. Diese Tatsache erleichterte uns den Nachweis einer eventuellen Bilirubinbildung. Wir hatten nämlich einfach nur qualitativ nachzuweisen, daß in dem vor dem Versuch bilirubinfreien Durchströmungsblut nach der Durchströmung Bilirubin vorhanden war. Bei Tieren hingegen, deren Blut auch normalerweise Bilirubin enthält, ist diese Aufgabe schwerer, denn dort wäre eine eventuelle Bilirubinproduktion nur durch quantitative Messungen zu beweisen. Die quantitative Bestimmung ist aber besonders bei so geringen Konzentrationen ziemlich ungenau auch mit der sich am besten bewährten und empfindlichsten *H. v. d. Bergh*schen Diazoreaktion (s. unten). Das Hundeblutserum enthält auch keine anderen störenden Farbstoffe (Lipochrom), wovon wir uns überzeugen können, wenn wir es mit der drei- bis vierfachen Menge Alkohol schütteln und filtrieren. Das Filtrat ist immer farblos oder kaum merkbar gelblich. Als weiterer Vorteil erwies sich auch im Laufe der Versuche, daß auch das Hundefett keinen gelben Farbstoff enthält. Nur diesem Umstand ist es zu verdanken, daß wir die Gelbfärbung des Fettgewebes erkannten, die, durch das Bilirubin bedingt, im Laufe des Versuchs auftrat und die wir nicht hätten beobachten können, wenn das Fett ursprünglich gelb gewesen wäre.

Die Versuchstiere hungerten 16 bis 18 Stunden vor dem Experiment, nur Wasser bekamen sie frei zu trinken. Wie andere Autoren, konnten auch wir infolge des nüchternen Zustandes öfters eine mäßige Bilirubinurie beobachten. Im Blute war aber auch in diesen Fällen kein Bilirubin vor-

handen, was der großen Harnfähigkeit des Bilirubins beim Hunde zuzuschreiben ist.

D. *Ausführung der Versuche.* In die Carotis wurde unter Äthermorphinnarkose eine Kanüle eingeführt und durch diese 200 bis 300 ccm Blut entnommen. Das Blut wurde durch Schütteln mit Glasperlen defibriniert und durch Gaze filtriert. Ein Teil des Blutes dient zur Füllung des Durchströmungsapparats, der andere zur vorherigen Durchspülung der Milz, um das fibrinogenhaltige Blut vollständig zu entfernen. Unsere ersten Versuche versagten nämlich darum, weil wir die isolierte Milz sofort in den Durchströmungsapparat brachten. Das aus der Milz fließende fibrinogenhaltige Blut koagulierte bald in der venösen Leitung und verhinderte die Fortsetzung des Versuchs. Zur vorherigen Durchspülung benutzten wir folgende, einem Infusionsapparat ähnliche Anordnung. Wir brachten das Blut in einen 300 ccm fassenden Zylinder. Dieser Blutbehälter stand in einem breiteren, mit warmem Wasser gefüllten Blechzylinder. Das Ganze war 1 m hoch über dem Arbeitstisch angebracht und setzte sich nach unten in ein 1 m langes Gummirohr fort, das unten in der Arterienkanüle endete. Vor die Kanüle war noch ein Bläschenfänger eingeschaltet. Der Blutbehälter, das Gummirohr und die Kanüle wurden mit 100 bis 150 ccm defibriniertem Blut angefüllt, dann das Gummirohr mit einer Klemme abgesperrt. Nach diesen Vorbereitungen befreiten wir die Milz, banden die von der Milz zu dem Magen und zum Netz führenden Blutgefäße ab, präparierten die Milzarterie sauber heraus und führten einen Faden unter derselben durch. Während des ganzen Vorganges wurde darauf geachtet, daß die Zirkulation der Milz ungestört sei. Die Milz wurde mit Kompressen gegen Abkühlung geschützt. Sodann wurde die Art. und Vena lienalis proximal von dem oben erwähnten Faden durchschnitten. Die so isolierte Milz wurde sofort in eine mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Schale gebracht, und die Kanüle des Vorspülungsapparats wurde in die Arterie eingeführt. Die Durchspülung wurde sofort begonnen und so lange fortgesetzt, bis 30 bis 40 ccm Blut die Milz passiert haben. Danach wurde auch in die Vene eine Kanüle gebunden, die Arterienkanüle von dem Vorspülungsapparat getrennt und nun die Milz in den vorher gefüllten Durchströmungsapparat gelegt, die zweite Kanüle an ihre entsprechenden Leitungen angepaßt und die Durchströmung sofort begonnen. Die Milz war in den meisten Versuchen in körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung suspendiert. In einigen späteren Versuchen legten wir die Milz ohne Kochsalzlösung in eine Porzellanschale, die sich in einem kleinen Thermostat befand. Beide Methoden haben ihre Vor- wie Nachteile. Bei der ersten Methode war es ein Vorteil, daß die Milz und das Fettgewebe nicht eintrockneten und so ihre Farbe behielten.

Dadurch war eine Gelbfärbung des Fettes während des Versuchs gut zu beobachten. Ein Nachteil war, daß durch kleine, nicht unterbundene oder verletzte Gefäße ein Teil des Blutes in die Kochsalzlösung gelangte und für die Zirkulation verloren ging. Ein Vorteil der zweiten Einrichtung war, daß das ausgetretene Blut sich am Grunde der Schale sammelte und von dort wieder in den Durchströmungsapparat gebracht werden konnte; ein Nachteil dagegen, daß das Fettgewebe trocken wurde, trotz der im Thermostat angebrachten feuchten Watte, und so die Gelbfärbung nicht so schön zur Beobachtung kam.

Die Durchströmung wurde in den meisten Versuchen 4 Stunden lang aufrechterhalten. Eine längere Versuchsdauer war nicht zweckmäßig, da die Milz nach vierstündiger Durchströmung stark zu schwellen begann. In mehreren Versuchen schwollen schon in den ersten 4 Stunden einmal kleinere, nur pfennigstückgroße, das anderemal größere, bis zur Hälfte des Organs betragende Partien an. Diese geschwollenen Partien waren dunkelrot und über der Oberfläche der Milz erhaben. Untersuchungen über die Ursache der Anschwellung führten wir nicht aus.

E. *Nachweis und quantitative Bestimmung des Bilirubins.* Das Durchströmungsblut enthielt viel gelöstes Hämoglobin. Ein Teil davon wurde als hämolysiertes Blut zu Beginn des Versuchs hinzugesetzt (siehe A. Allgemeine Beschreibung), ein anderer Teil wurde aus den während des Versuchs zugrunde gehenden Blutkörperchen frei. Der Bilirubingehalt des Blutserums konnte nur nach Entfernung dieses gelösten Hämoglobins bestimmt werden. Das Hämoglobin und das übrige Eiweiß können durch Fällung mit Alkohol entfernt werden. *H. v. d. Bergh* empfiehlt zwecks Enteiweißung eine Fällung mit der doppelten Menge 96proz. Alkohols. Das Hundeblutserum enthielt aber nach diesem Verfahren noch immer so viel Hämoglobin, daß dadurch der Nachweis von Bilirubin verhindert war. Wahrscheinlich bezieht es sich hierauf, wenn *Retzlaff* (6) auf unsere vorhergehende Mitteilung bemerkt, daß Bilirubin in hämoglobinhaltigem Blute schwer nachzuweisen ist. Dieser Einwand ist aber nicht stichhaltig. Brachten wir nämlich das Serum nicht mit der zweifachen, sondern der vierfachen Menge Alkohol zusammen, so enthielt das Filtrat gar kein Hämoglobin, und die Bilirubinreaktion war einwandfrei ausführbar. Enthielt das Blut kein Bilirubin, so war das Filtrat nach der Fällung mit der vierfachen Menge Alkohol farblos oder kaum merkbar gelblich gefärbt. Enthielt aber das Blut Bilirubin, so war das Filtrat mehr oder weniger stark gelb gefärbt. Die Anwesenheit von Bilirubin ist also schon an der gelben Farbe des alkoholischen Filtrats zu erkennen, da im Hundeblut kein anderer gelber Farbstoff vorhanden ist. Daß der während der Versuche gebildete Farbstoff tatsächlich Bilirubin war,

bewies in erster Reihe die Diazoreaktion. Die Diazoreaktion führten wir nach der Beschreibung *H. v. d. Berghs* aus: zu 2 ccm des Filtrats wurden 0,25 ccm Diazoreagens zugesetzt und gut vermischt. Die Mischung wurde meistens durch Ausfallen von Fettsubstanzen getrübt; nach Zugabe einiger Tropfen Äther hellte sie sich aber wieder auf. In Gegenwart von Bilirubin zeigte die Flüssigkeit eine rote Färbung. Nach Zugabe von Säure bzw. Alkali änderte sich die rote Farbe in die charakteristische blauviolette bzw. grünlichblaue um. Die Diazoreaktion beweist an und für sich genügend, daß der gebildete Farbstoff mit dem Bilirubin identisch ist. Trotzdem trachteten wir, den gelben Farbstoff auch auf anderem Wege zu identifizieren. Wir führten vor allem die *Hammarsten*sche Reaktion aus. Diese Reaktion ist zwar weniger empfindlich als die Diazoreaktion, aber auch sie war positiv in allen jenen Fällen, wo wir eine intensive Diazoreaktion fanden. Zu der *Hammarsten*schen Reaktion wurde, sowie zur Diazoreaktion, auch das alkoholische Serumfiltrat benutzt. Zu 2 bis 3 ccm des Filtrats wurden 1 bis 4 Tropfen *Hammarsten*sches Reagens zugesetzt. In Anwesenheit von Bilirubin entstand binnen kurzer Zeit eine dauernde blaugrüne Färbung. In einigen Fällen probierten wir auch, die *Gmelin*sche Reaktion auszuführen. Diese Reaktion ist noch weniger empfindlich, so daß wir in dem alkoholischen Filtrat nach direkter Untersuchung nie ein positives Ergebnis bekamen, sondern nur nach Konzentrierung der Lösung. Dies geschah folgenderweise: Zu 3 ccm Blut setzten wir 8 ccm Aceton hinzu, mischten und filtrierten dann. Das Filtrat wurde bei Zimmertemperatur eingedampft und der Rückstand mit einigen Kubikzenzimetern Wasser in einen 25-ccm-Schüttelzylinder gebracht. Nach Zugabe von 2 ccm n/10 Lauge wurde zwecks Entfernung der Fettstoffe dreimal mit je 10 ccm Äther ausgeschüttelt. Nach Entfernung des Äthers wurden zu der wässerigen Lösung zwei Tropfen von reiner konzentrierter Salzsäure (eisen- und chlorfrei) zugesetzt und neuerdings zweimal mit 5 ccm Äther ausgeschüttelt. Die ätherische Lösung wurde in einem Uhrglas vorsichtig verdampft. Bevor sie ganz eingedampft war, wurde die bisher gelbe Flüssigkeit plötzlich grün durch die Oxydation des Bilirubins zu Biliverdin durch den Luftsauerstoff. Der grüne Rückstand wurde in wenig Chloroform gelöst, in eine dünne Eprouvette überführt und nun die *Gmelin*sche Säuremischung darübergeschichtet. War der Bilirubingehalt des Blutes groß genug, so entstehen die für die *Gmelin*reaktion charakteristischen Farbenringe.

Außer diesen Farbenreaktionen wurden die Löslichkeitsverhältnisse und das spektrale Verhalten des entstandenen Farbstoffs untersucht. Der Farbstoff war in Wasser bei alkalischer Reaktion löslich und konnte aus dieser durch Äther oder Chloroform nicht ausgeschüttelt werden, wohl aber nach Ansäuerung der Lösung. Der ätherischen oder Chloro-

formlösung kann er durch alkalisches Wasser neuerdings entzogen werden. Der Farbstoff zeigt in wässeriger, ätherischer oder Chloroformlösung keine Absorptionsstreifen, sondern eine kontinuierliche, gegen Violett zunehmende Absorption der Spektralfarben. All diese Eigenschaften entsprechen völlig denen des Bilirubins. *Wir müssen also den gebildeten gelben Farbstoff mit dem Bilirubin als identisch betrachten.*

Die Blutproben, die in den ersten 1½ Stunden der Durchströmung entnommen waren, zeigten keinen oder nur sehr geringen Bilirubingehalt. Gewöhnlich erschienen die ersten Spuren von Bilirubin gegen Ende der zweiten Stunde, und nun stieg der Bilirubingehalt bis zum Ende der vierten Stunde stetig an. Nach dieser Zeit war keine Erhöhung der Bilirubinkonzentration mehr zu verzeichnen.

Die quantitative Bestimmung führten wir nach *H. v. d. Bergh* aus. Zur Enteiweißung des Blutes gebrauchten wir aus oben angeführten Gründen nicht die zwei-, sondern die vierfache Menge Alkohol. Es ist hier zu bemerken, daß die Farbe des entstandenen Diazobilirubins nicht immer mit der Farbe der Vergleichsflüssigkeit (Ferrirhodanid in Äther gelöst) übereinstimmte, sondern besonders bei geringen Bilirubinwerten im Vergleich einen mehr roten oder gelblichen Stich hatte. Dieselbe Erscheinung ist auch bei den Bilirubinbestimmungen im menschlichen Blutserum zu beobachten. Dieser Umstand erschwerte die exakte kolorimetrische Untersuchung. Die von *H. v. d. Bergh* beschriebene Ferrirhodanidlösung fanden wir zur Bestimmung von niedrigen Bilirubinwerten zu konzentriert. Wir verdünnten sie deshalb mit Äther auf das Doppelte und benutzten die so verdünnte Lösung zur Füllung des Vergleichskeils. Dieser Keil wurde mit einer Bilirubinlösung geeicht. Das zu diesem Zwecke dienende Bilirubin wurde nach dem Verfahren von *Küster* aus Rindergallensteinen hergestellt und aus Dimethylanilin umkristallisiert.

Die quantitative Bestimmung des Bilirubins geschah am Anfang im Blutserum, in den späteren Versuchen im Gesamtblut, denn die gesamte Bilirubinbildung konnte nur auf diese Weise ermittelt werden.

F. *Der Nachweis des Bilirubins im Fettgewebe.* Es wurde schon erwähnt (s. C. Versuchstiere), daß in den meisten Versuchen während der Durchströmung das Fettgewebe des Milzhilus eine gelbe Farbe annahm. Es war wahrscheinlich, daß diese Gelbfärbung durch das Bilirubin verursacht war, das in der Milz gebildet, auf dem Wege der Blutgefäße in das Fett gelangte und dort sich abgelagert hatte. Zur Prüfung dieser Annahme trachteten wir den Nachweis des Bilirubins im Fettgewebe zu führen. Zuerst probierten wir das Verfahren von *Whipple* und *Hooper*. Dieses besteht darin, daß man das zerhackte Fett mit der dreifachen Menge Alkohol (mit Weinsteinsäure angesäuert) während 12 Stunden bei Körpertemperatur stehen läßt, dann filtriert. Das Filtrat wird auf Gallenfarbstoff untersucht. Auf diese Art konnten wir das Bilirubin nicht nachweisen, denn das Filtrat war eine schmutzige graubraune Flüssigkeit, mit der

keine Farbenreaktionen auszuführen waren. Als viel besseres Extraktionsmittel erwies sich das Aceton. Wenn wir Bilirubin enthaltendes Fett in Aceton legen, so entzieht das Aceton binnen 10 bis 12 Stunden dem Fettgewebe das Bilirubin; wenn wir zu dieser Aceton-Bilirubinlösung 1 bis 2 Tropfen *Hammarsten*-Säuremischung zusetzen, so entsteht eine blaugrüne Färbung infolge der Entstehung von Bilirubin. Der Bilirubinnachweis kann auch folgendermaßen geschehen: 1 bis 2 g Fettgewebe werden mit 4 bis 5 ccm Aceton und 2 bis 3 Tropfen Hammarstenreagens stehengelassen. Nach 8 bis 10 Stunden wird das Fettgewebe entfärbt und das Aceton nimmt eine blaugrüne Farbe an. Letzteres Verfahren ist das empfindlichere. Mit dem Acetonextrakt ist auch die Diazoreaktion ausführbar, indem wir 3 g zerhacktes Fett mit 10 ccm Aceton und 1 Tropfen Acid. hydrochloricum dilutum aufkochen, 10 Minuten abkühlen lassen, dann filtrieren. Das Filtrat ist ein wenig trübe, braungelblich. Wenn wir nun zu dem Filtrat den vierten Teil Diazoreagens und so lange Äther zusetzen, bis die Flüssigkeit sich aufhellt, so erhalten wir eine rot gefärbte Flüssigkeit, die nach Zusetzen von Lauge bzw. Säure die der Diazoreaktion eigenen Farbenveränderungen zeigt.

Diese Reaktionen beweisen also ohne Zweifel, daß die Gelbfärbung des Fettes durch Bilirubin hervorgerufen wird. Der Nachweis des Bilirubins auf histologischem Wege ist nicht gelungen.

Versuchsergebnisse.

1., 2. und 3. Versuch. In diesen Versuchen begannen wir die Durchströmung gleich nach der Einführung der Kanülen in die entsprechenden Milzgefäße, ohne die Milz vorher durchgespült zu haben. Die Folge davon war, daß das der Milz entströmende fibrinogenhaltige Blut in dem Apparat bald geronnen war und so die weitere Durchströmung unmöglich machte.

In den späteren Versuchen durchspülten wir die Milz vor der eigentlichen Durchströmung mit Hilfe der oben angegebenen Vorrichtung (siehe D.).

In dem *4. Versuch* (23. April 1924) führten wir dieses Durchspülen mit 50 ccm Ringerlösung aus. Zur Durchströmung wurde folgende Blutmischung angewendet: 5 ccm defibrinierten Blutes wurden mit 10 ccm destillierten Wassers hämolysiert, nach 5 Minuten wurde 1 ccm zehnfach konzentrierter Ringerlösung zugesetzt, um das Gemisch isotonisch zu machen (s. A.). Zu diesem 16 ccm gelöstes Hämoglobin enthaltenden Blute wurden 100 ccm Blut-Ringergemisch (2 : 1) gegeben. Das gesamte Blutgemenge betrug 116 ccm und beiläufig $\frac{1}{3}$ davon war Ringerlösung. Die Durchströmung konnten wir $2\frac{1}{2}$ Stunden fortsetzen. Bilirubin war im Blute nicht nachzuweisen.

Trotz des negativen Ergebnisses setzten wir unsere Versuche fort und trachteten, die Asphyxiezeit der Milz durch rasches Vorgehen womöglich zu verringern, die Durchströmungsdauer zu verlängern und den Gebrauch von Ringerlösung zu beschränken bzw. wegzulassen.

5. Versuch. 28. April 1921. Gewicht des Hundes 15 kg. Asphyxiezeit 9 Minuten, Durchspülung mit einer Ringer-Blutmischung (1 : 1). Durchströmung mit 114 ccm Blutmenge während 4 Stunden. Strömungs-

geschwindigkeit 4 bis 5 ccm pro Minute. Blutdruck 60 mm Hg, später 40, endlich 30 mm Hg. Am Ende des Versuchs war im Blutserum Bilirubin in Spuren nachweisbar (Diazoreaktion schwach positiv). Vor dem Versuch hatte das Blutserum kein Bilirubin enthalten.

In den folgenden Versuchen wurde der Gebrauch von Ringerlösung ganz ausgeschaltet, indem nicht nur zur Durchströmung, sondern auch zur vorhergehenden Durchspülung unverdünntes defibriniertes Blut verwendet wurde. Zum Versuch wurde nur so viel Ringerlösung verwendet, wie viel Kubikzentimeter destilliertes Wasser zur Hämolysierung von 5 bis 10 ccm Blut verbraucht worden war. Das destillierte Wasser wurde nämlich nach der vorgenommenen Hämolyse mit konzentrierter Ringerlösung isotonisch gemacht.

6. Versuch. 9. Mai 1921. Gewicht des Hundes 20 kg. Dauer der Asphyxie 8 Minuten. Vorhergehende Durchspülung mit defibriniertem Blute. Durchströmung mit 135 ccm Blutgemisch (10 ccm Blut + 15 ccm destilliertes Wasser, nach Isotonisierung + 110 ccm defibriniertes Blut). Strömungsgeschwindigkeit anfangs 6 bis 7, später 12 bis 15 ccm pro Minute. Blutdruck erst 60, später 50 mm Hg. Versuchsdauer 4¾ Stunden. 2½ Stunden nach Beginn des Versuchs enthält das Blut kein Bilirubin. Am Ende der vierten Stunde enthalten 100 ccm Blut 1,0 mg Bilirubin. Nach Beendigung des Versuchs wurde die Milz untersucht. In etwa ⅓ Teil der Milz war keine Zirkulation vorhanden; dieser Teil war geschwollen, weich, dunkelbläulich und das mit ihm zusammenhängende Fettgewebe schmutzig graurot. Dieser Teil der Milz war scharf abgegrenzt gegen das andere, größere, durchströmt gewesene Gebiet, das von fester Konsistenz und von blaugrauer Farbe war. Das mit diesem letzteren Teile zusammenhängende Fettgewebe war gelb. Die gelbe Farbe war nicht gleichmäßig stark; an den Teilen, die der Milz näher lagen, war sie stärker als an jenen, die den Abbindungen nahe waren, wo die Zirkulation träger gewesen sein mochte. Es ist uns nicht gelungen, im gelben Fettgewebe Bilirubin nachzuweisen, da uns zu dieser Zeit die unter F. beschriebene Acetonmethode noch nicht zur Verfügung stand.

Durch diesen 6. Versuch war also zweifellos bewiesen, daß sich in der Milz Bilirubin bildet. Es ist die Frage, welchem Umstand es zuzuschreiben ist, daß das Bilirubin im 5. Versuch nur in Spuren, im 6. aber in ausgesprochenen Mengen gebildet wurde. Der Unterschied zwischen den beiden Versuchen war nur der, daß wir bei der vorhergehenden Durchspülung in Versuch 5 ein mit Ringerlösung verdünntes, in Versuch 6 aber unverdünntes defibriniertes Blut gebrauchten. Es ist möglich, daß die Bilirubinbildung in der Milz durch die Ringerlösung [wenigstens in der von uns gebrauchten Zusammensetzung (7)] schädlich beeinflußt wird. Mit Rücksicht darauf benutzten wir in unseren weiteren Versuchen zur vorhergehenden Durchspülung unverdünntes defibriniertes Blut.

Auf diese Weise führten wir acht weitere Versuche aus; die diesbezüglichen Daten sind auf der nebenstehenden Tabelle zu sehen.

Versuchs-Nr.	Datum	Gewicht des Hundes	Milz-asphyxiezeit	Zur Durchströmung gebrauchte Blutmenge		Blutstrom-geschwindigkeit	Blutdruck zu Beginn und Ende des Versuchs	Versuchsdauer	Bilirubingehalt des Blutes			Fettgewebe		Anmerkungen
				totales Volumen	hämolysierter Anteil				zu Beginn des Versuchs	am Ende des Versuchs: qualitative Untersuchung	am Ende des Versuchs: in 100 ccm Blut	Farbe am Ende des Versuchs	Chem. Nachweis des Bilirubins	
	1921	kg	Min.	ccm	ccm	ccm pro Min.	mm Hg	Std.			mg			
7	12. V.	16	7	120	5	4—7	70—58	6	θ	*Diazo* + *Hammarsten* + *Gmelin* +	1,6	gelb	+	—
8	14. V.	19	4	140	10	6—8	58—42	$4^1/_2$	θ	*Diazo* + *Hammarsten* + *Gmelin* +	2,8	stark gelb	+	—
9	18. V.	16	5	100	13	4—6	*	5	θ	*Diazo* + *Hammarsten* +	0,6	schwach gelb	—	In der Hälfte der Milz war aus unbekannten Gründen keine Zirkulation.
10	24. V.	15,5	$4^3/_4$	120	8	9—10	60—20	6	θ	*Diazo* + *Hammarsten* + *Gmelin* +	2,2	stark gelb	+	—
11	12. VI.	16	15	100	8	5—6	*	$4^1/_2$	θ	*Diazo* schwach +	0,2	blaß graurosa	—	—
12	23. VIII.	11,5	$3^3/_4$	80	9	*	60—25	5	θ	Am Ende der 2. Stunde *Diazo* +	0,3	gelblich	—	Am Ende des Versuchs ist das Blutbilirubin nicht geprüft worden.
13	29. VIII.	*	4	*	*	3—4	60—20	$4^3/_4$	θ	*Diazo* + *Hammarsten* +	1,0	gelb	+	Wegen Verletzung mußte eine größere Vene abgebunden werden; infolgedessen war in der Hälfte der Milz keine Zirkulation.
14	7. IX.	12	20	*	*	6—7	60—20	3	θ	*Diazo* + *Hammarsten* +	0,8	gelb	+	—

Aus nebenstehender Zusammenstellung ist zu ersehen, daß in allen acht Versuchen Bilirubin gebildet wurde. Das zur Durchströmung gebrauchte Blut enthielt vor dem Versuche nie Bilirubin. Am Ende des Versuchs war der Bilirubingehalt des Blutes verschieden. Warum in einem Versuch mehr, im anderen weniger Bilirubin gebildet wurde, können wir nicht begründen. Vielleicht haben individuelle Eigenschaften der Versuchstiere einen Einfluß hierauf. Es ist auch möglich, daß die Dauer der Milzasphyxie eine Rolle spielte insofern, daß eine längere Asphyxiezeit die Bilirubinbildung vermindert. So war die Asphyxiedauer im Versuch 11 wegen operativer Schwierigkeiten 15 Minuten, also lang. Bilirubin wurde in diesem Versuch nur in Spuren gebildet. In den Versuchen 7, 8, 10 und 13 war die Asphyxiezeit kurz; in diesen Versuchen ist viel Bilirubin entstanden. Dieser Zusammenhang ist aber kein strenger, denn z. B. bildete sich in Versuch 14 trotz 20 Minuten Asphyxiezeit eine mittelgroße Menge Bilirubin. In Versuch 9 dagegen entstand trotz kurzer Asphyxiezeit verhältnismäßig wenig Bilirubin; da war aber nur die Hälfte der Milz durchströmt worden, was die Ursache der verminderten Bilirubinbildung sein konnte. Die Diazoreaktion gab in sämtlichen Fällen ein positives Resultat. In sechs Versuchen war die *Hammarsten*sche, in drei Versuchen die *Gmelin*sche Reaktion positiv. Das Fettgewebe war, Versuch 11 und 12 abgerechnet (wo auch im Blute weniger Bilirubin erschienen war), ausgesprochen gelb, und in diesen Versuchen konnte das Bilirubin auch chemisch mittels der unter F. beschriebenen Acetonmethode nachgewiesen werden.

In den bisher beschriebenen Versuchen war in dem zur Durchströmung gebrauchten Blute Ringerlösung enthalten. Diese Ringerlösung kam bei der Hämolysierung von einem kleinen Teile des Blutes hinein, die vor dem Versuch mittels destillierten Wassers vorgenommen wurde; nach Beendigung der Hämolyse wurde nämlich das destillierte Wasser mit konzentrierter Ringerlösung isotonisch gemacht. Auf diese Weise gelangten in das zum Durchströmen gebrauchte Blut, welches 80 bis 140 ccm betrug, etwa 8 bis 20 ccm Ringerlösung. In unserer Bemerkung zu Versuch 6 haben wir erwähnt, daß die Anwesenheit von größeren Mengen Ringerlösung für die Bilirubinbildung schädlich zu sein scheint. Wir mußten die Frage aufwerfen, ob nicht die Bilirubinbildung noch hochgradiger wäre, wenn überhaupt keine Ringerlösung ins Blut käme. In dieser Richtung führten wir weitere zwei Versuche aus. In dem Versuch 15 benutzten wir zur Durchströmung unverdünntes defibriniertes Blut, ohne jede vorhergehende Hämolysierung. Das Blut enthielt also kein gelöstes Hämoglobin, infolgedessen konnte als Substrat zur Bilirubinbildung nur das Hämoglobin der unversehrten roten Blutkörperchen dienen.

11. Versuch. 3. November 1922. Gewicht des Hundes 20,5 kg. Asphyxiedauer 4½ Minuten. Durchströmung mit 100 ccm defibrinierten Blutes. Strömungsgeschwindigkeit 9 bis 10 ccm. Blutdruck 60 bis 20 mm Hg. Dauer des Versuchs 4½ Stunden. Vor der Durchströmung enthält das Blut kein Bilirubin, nachher enthielten 100 ccm 0,9 mg. Das Blutserum ist schwach rot, enthält gelöstes Hämoglobin.

Die Menge des im Versuch 15 gebildeten Bilirubins entspricht dem Durchschnittswert der bisherigen Versuche, d. h. wir beobachteten die erwartete Steigerung der Bilirubinbildung nicht. Dies konnte zwei Gründe haben; der eine ist, daß die geringe Menge Ringerlösung, die in den Versuchen 6 bis 14 anwesend war, die Bilirubinbildung nicht beeinträchtigt, daß also auch in Versuch 15 sich nicht mehr Bilirubin hätte bilden sollen. Der andere Grund hätte sein können, daß die Milz vielleicht doch nicht fähig ist, das Hämoglobin der unverletzten roten Blutkörperchen aufzuarbeiten. Nachdem doch Bilirubin entstanden war, konnte es nur vom Hämoglobin der während des Versuchs aufgelösten roten Blutkörperchen herstammen. Im Serum war am Ende des Versuchs freies Hämoglobin vorhanden, aber bei weitem nicht in solchen Mengen, wie in den vorhergegangenen Versuchen. Dieses freie Hämoglobin stammt von den in dem Versuch zugrunde gegangenen roten Blutkörperchen ab. Die roten Blutkörperchen werden wahrscheinlich nicht durch die Milz, sondern durch den Apparat selber zerstört. Die Hundeblutkörperchen sind nämlich sehr empfindlich und werden schon durch Wassertröpfchen zerstört, die sich aus dem Wasserdampf an den kälteren Teilen des Apparats niedergeschlagen haben. Davon haben wir uns so überzeugt, daß wir in dem Apparat auch dann eine Hämolyse beobachtet haben, wenn das Blut ohne Einschaltung der Milz im Apparat zirkulierte.

Nachdem der 15. Versuch keine entschiedene Antwort auf die aufgeworfene Frage gegeben hatte, wiederholten wir den Versuch auf die Weise, daß wir eine größere Menge Hämoglobin in das defibrinierte Blut brachten, aber nicht durch Hämolyse, sondern durch Auflösen von reinem Hämoglobin.

16. Versuch. 8. November 1922. Gewicht des Hundes 15 kg. Asphyxiezeit 7 Minuten. Durchströmung mit 100 ccm defibrinierten Blutes, worin vor dem Versuch 3 g kristallinisches Hämoglobin gelöst wurden. Das Hämoglobin ist aus Hundeblut nach *Hoppe-Seyler* hergestellt worden. Dauer des Versuchs 4 Stunden. Vor dem Versuch ist im Blute kein Bilirubin nachweisbar, am Ende des Versuchs enthalten 100 ccm 0,5 mg.

Es war also auch in diesem Versuch nur eine mäßige Menge Bilirubin entstanden, trotzdem daß viel gelöstes Hämoglobin als Substrat der Bilirubinbildung ins Blut gebracht worden ist und daß das Blut gar keine Ringerlösung enthalten hat. Dieser Versuch zeigt also, daß die kleine Menge Ringerlösung, die in den Versuchen 6 bis 14 dabei war, nicht schädlich auf die Bilirubinerzeugung einwirkt.

Als sehr interessant hätte sich die Untersuchung dessen erwiesen, wie sich das in der Milz erzeugte Bilirubin der von *H. v. d. Bergh* beschriebenen direkten und indirekten Diazoreaktion gegenüber verhält. Nach *H. v. d. Bergh* gibt nämlich das extrahepatogen entstandene — nach seiner Benennung dynamische — Bilirubin nur die indirekte Reaktion. In unseren Versuchen waren leider diese Untersuchungen durch den hohen Hämoglobingehalt des Serums verhindert. Infolge der Farbe des Hämoglobins war nämlich die unmittelbare Ausführung der direkten Reaktion unmöglich. Wir versuchten, das Hämoglobin aus dem Serum zu entfernen, aber auch dies führte zu keinem Resultat, weil die Entfernung nur mit solchen Reagenzien gelang, welche das bloß die indirekte Reaktion gebende Bilirubin in ein solches überführen, das die direkte Reaktion gibt (z. B. Alkohol, Aceton). Die Trennung gelingt auch durch Ultrafiltration nicht, weil das Bilirubin zusammen mit dem Hämoglobin auf dem Filter bleibt.

Zusammenfassung.

In der isolierten Hundemilz entsteht Bilirubin, wenn sie mit defibriniertem Blute durchgeströmt wird. Aus 16 diesbezüglichen Versuchen ist in den ersten vier Versuchen die Durchströmung aus technischen Gründen nur für eine kurze Zeit gelungen. In diesen Versuchen ist kein Bilirubin entstanden. In den übrigen 12 Versuchen haben wir die Milz 4 bis 5 Stunden lang durchströmen lassen. Während dieser Zeit ist in allen 12 Versuchen mehr oder weniger Bilirubin gebildet worden. Die Zeit, während welcher die Milz ohne Zirkulation geblieben ist, hat einen Einfluß auf die Größe der Bilirubinerzeugung. Wenn diese Zeit kurz ist, dann ist die Bilirubinbildung größer. Die Größe der Bilirubinerzeugung wird nicht beeinträchtigt, wenn das zur Durchströmung gebrauchte defibrinierte Blut ein wenig Ringerlösung enthält. Eine größere Menge Ringerlösung vermindert aber die Bilirubinbildung. Das in der Milz entstandene Bilirubin gelangt mit dem Blutstrom in das Fettgewebe, das mit dem Milzhilus zusammenhängt, und färbt es gelb; das Bilirubin ist im Fettgewebe chemisch nachweisbar.

Diese Versuche liefern einen direkten Beweis dessen, daß eine extrahepatogene Bilirubinbildung möglich ist.

Literatur.

1) *Hijmans v. d. Bergh*, Der Gallenfarbstoff im Blute. Leipzig 1918. — 2) *Leschke*, Deutsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 14. — 3) *Guillau* et *Troisier*, Semaine médicale 1909, Nr. 12. — 4) *Whipple* und *Hooper*, Journ. of exper. Med. 1913. — 5) *Ernst* und *Szappanyos*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 13; Orvosi Hetilap 1921, Nr. 30. — 6) *Retzlaff*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **34**, 181. — 7) *Abderhalden*, Biochem. Arbeitsmeth. **8**, 1, S. 327.

Untersuchungen über extrahepatogene Gallenfarbstoffbildung an überlebenden Organen.

II. Mitteilung:

Untersuchungen an überlebender Milz, Niere und Lunge.

Von

Z. Ernst.

(Aus der I. medizinischen Klinik der königl. ungar. Pázmány-Péter-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 17. Januar 1925.)

In unseren Versuchen mit *Szappanyos* (1) konnten wir nachweisen, daß in der überlebenden Hundemilz Bilirubin entsteht. Der Umstand, der uns auf eine Bilirubin erzeugende Eigenschaft der Milz folgern ließ, war der, daß, während in dem zur Durchströmung verwendeten Blute vor der Durchströmung kein Bilirubin nachzuweisen war, wir darin während der Durchströmung einen nach und nach steigenden Bilirubingehalt fanden. Es ist aber fraglich, ob die Erscheinung, daß in dem Durchströmungsblut Bilirubin erscheint, keine andere Erklärung haben könne, als daß die Milz das Bilirubin bildet. So dachten wir erstens daran, ob nicht Bakterien die beobachtete Bilirubinbildung hervorrufen könnten. Weiter dachten wir daran, daß das Bilirubin in den Versuchen vielleicht gar nicht neu gebildet wird, sondern in der Milz abgelagert war und während der Durchströmung von dort ausgelaugt in das Blut gelangt. Zur Untersuchung dieser Frage führten wir weitere Versuche aus. Diese zeigten, daß die Bilirubinbildung weder auf Bakterienwirkung noch auf ein Auslaugen zurückzuführen ist, sondern eine Milzfunktion darstellt.

Es schien auch von Interesse zu untersuchen, ob nur die Milz oder auch andere Organe die Fähigkeit zur Bildung von Bilirubin besitzen. Alle diese Versuche machen wir im folgenden bekannt.

Ist die Bildung von Bilirubin durch Bakterien bedingt?

In der Literatur fanden wir keine Angaben in bezug darauf, ob Bakterien Bilirubin bilden können. An diese Möglichkeit muß aber

gedacht werden. *Retzlaff* (2) glaubt, daß die Bilirubinbildung in unseren Versuchen mit *Szappanyos* von Bakterien verursacht war. Seine Behauptung rechtfertigt er damit, daß wir weder die Blutentnahme noch die Versuche steril ausführten; demzufolge das Blut mit allerhand Bakterien verunreinigt sein konnte, deren Wirkung wir auf die Bilirubinbildung nicht ausschließen konnten. Dies ist wahr; wir führten unsere Versuche nicht steril durch. Der Durchströmungsapparat ist mit seinen vielen Behältern und Leitungen sehr schwer vollkommen zu sterilisieren. Eine sterile Ausführung würde den ohnedies umständlichen Versuch noch mehr erschwert haben; außerdem hielten wir für unwahrscheinlich, daß wir die Sterilität auf die lange Dauer des Versuchs aufrecht hätten erhalten können. Darum machten wir auch keinen Versuch in dieser Richtung, sondern suchten die Frage auf andere Art zu lösen. Wenn nämlich Bakterien die Bilirubinbildung verursachen, so sind diese Bilirubin bildenden Bakterien — die wir kurzerhand „Bilirubinbakterien" nennen werden — so in dem zur Durchströmung verwendeten Blute wie in dem Apparat überall gegenwärtig. Der Nachweis dieser Bilirubinbakterien wäre folgender: Man versetzt eine größere Menge bilirubinfreies Blut mit Bilirubinbakterien enthaltendem Blute und beobachtet, ob Bilirubinbildung zustande kommt. Die Versuchseinrichtung zur Prüfung dieser Annahme war folgende:

Wir führten im *Brodie*schen Apparat den typischen Milzdurchströmungsversuch aus (Milzversuch). Die Methodik ist in der vorigen Mitteilung angegeben. Nach 4 Stunden nahmen wir die Milz aus dem Apparat, stellten eine direkte Verbindung zwischen arterieller und venöser Leitung her und ließen schließlich den größten Teil des Blutes aus dem Apparat ab. In dem Apparat verblieben nur etwa 2 bis 4 ccm Blut, das mit den angeblichen Bilirubinbakterien verunreinigt war. Zu diesen 2 bis 4 ccm wurden 100 ccm frisches defibriniertes Blut zugesetzt. Von den 100 ccm waren 5 ccm auf die gewöhnliche Art hämolysiert worden. Dann ließen wir das Blut 4 Stunden lang im Apparat zirkulieren unter denselben Versuchsbedingungen wie im Milzversuch; also warm gehalten, mit Sauerstoff durchströmt usw. (Kontrollversuch). Nach 4 Stunden bestimmten wir den Bilirubingehalt des Blutes.

Das am Ende des Milzversuchs aus dem Apparat entleerte Blut untersuchten wir noch derartig, daß wir es in frisches Blut impften und ohne Sauerstoffdurchströmung 4 Stunden lang warm gehalten haben. Endlich untersuchten wir auch das frische Blut in ähnlicher Weise. Die einzelnen Versuche sind folgende:

1. Versuch. 26. August 1921.

A. Milzversuch. Über das Gewicht des Hundes sind keine Angaben vorhanden. Dauer der Milzasphyxie 10 Minuten. Durchströmung

$4\frac{1}{2}$ Stunden lang mit 100 ccm defibrinierten Blutes. Vor dem Versuch ist im Blute kein Bilirubin nachzuweisen, nach $4\frac{1}{2}$ Stunden enthalten 100 ccm 0,4 mg Bilirubin. Das Fettgewebe ist blaßgelblich. Die gelbe Färbung ist ausgesprochener an den nahe der Milz gelegenen Partien. Das Fettgewebe enthält wenig Bilirubin.

B. Kontrollversuch. Nach der Entfernung der Milz ließen wir das Blut aus dem Apparat bis auf 3 bis 4 ccm ab und ersetzten es mit 100 ccm frischen Blutes. Das Blut zirkulierte 4 Stunden lang im Apparat. Nach den 4 Stunden war im Blute kein Bilirubin nachzuweisen.

2. Versuch. 17. Dezember 1921.

A. Milzversuch. Gewicht des Hundes 18 kg. Durchströmung 4 Stunden lang mit 100 ccm Blut. Vor dem Versuch enthält das Blut kein Bilirubin, nach demselben 1,0 mg in 100 ccm. Das Fettgewebe ist hellgelb, darin Bilirubin nicht nachweisbar.

B. Kontrollversuch. 1. Das nach dem Milzversuch aus dem Apparat entnommene Blut gaben wir in einen zweiten *Brodie*schen Apparat und ließen es darin 4 Stunden zirkulieren. Bilirubingehalt von 100 ccm Blut nach 4 Stunden 0,9 mg. Vor dem Versuch war in 100 ccm 1,0 mg Bilirubin enthalten; ein Steigen des Bilirubingehalts während des Versuchs ist also nicht vorhanden.

2. Dem im ersten *Brodie*schen Apparat zurückgebliebenen Blute setzten wir 100 ccm frischen Blutes hinzu und ließen es 4 Stunden zirkulieren. Im Blute war sowohl am Anfang als am Ende des Versuchs Bilirubin in Spuren nachzuweisen. Diese geringe Menge Bilirubin stammte aus dem Milzversuch und war in dem im Apparat zurückgelassenen Blute enthalten.

3. Versuch. 18. Januar 1922.

A. Milzversuch. Gewicht des Hundes 20 kg. Dauer der Asphyxie 7 Minuten. Durchströmung während 4 Stunden mit 100 ccm Blut. Vor dem Versuch enthält das Blut kein Bilirubin, nach dem Versuch $2\frac{1}{2}$ mg in 100 ccm. Das Fettgewebe ist stark ikterisch und enthält viel Bilirubin.

B. Kontrollversuch. 1. 20 ccm Blut erhielten wir in einem Reagenzrohr 4 Stunden lang auf einer Temperatur von 37° C. Bilirubinproduktion war keine vorhanden.

2. In einem zweiten *Brodie*schen Apparat ließen wir zugleich mit dem Milzversuch 50 ccm Blut, mit Sauerstoff durchströmt, 4 Stunden lang zirkulieren; es entstand kein Bilirubin.

3. Zu 2 ccm des aus dem Milzversuch stammenden Blutes gaben wir 18 ccm frischen Blutes und hielten es 4 Stunden lang auf der Temperatur von 37°. Das Blut enthielt so vor wie nach den 4 Stunden 0,2 mg Bilirubin in 100 ccm.

4. Nach Beendigung des Versuchs nahmen wir die Milz aus dem Apparat, ließen das Blut bis auf 3 bis 4 ccm ab, schütteten 100 ccm frischen Blutes nach und ließen es im Apparat während 4 Stunden zirkulieren. Das Blut enthielt sowohl am Anfang wie am Ende des Versuchs spurenweise Bilirubin.

Das in dem dritten und vierten Kontrollversuch im Blute gefundene Bilirubin entspricht dem Bilirubingehalt jenes (einige Kubikzentimeter) Blutes, das nach dem Milzversuch im Apparat verblieben war.

4. Versuch. 26. Januar 1922.

A. Milzversuch. Gewicht des Hundes 16 kg. Dauer der Asphyxie 20 Minuten. Durchströmung während 4 Stunden mit 130 ccm Blut. Im Blute war vor dem Versuch kein Bilirubin, am Ende des Versuchs 1,6 mg in 100 ccm vorhanden. Das Fettgewebe ist stellenweise gelb und enthält Bilirubin.

B. Kontrollversuche. Ihre Ausführung geschah wie die der entsprechenden Kontrollversuche im 3. Versuch.

In den Kontrollversuchen 1 und 2 war keine Bilirubinbildung vorhanden.

In den Kontrollversuchen 3 und 4 war sowohl am Anfang wie am Ende des Versuchs im Blute Bilirubin nur in Spuren nachzuweisen.

Diese Versuche 1 bis 4 zeigen, daß das zur Durchströmung verwendete Blut weder in frischem Zustande noch nach der vierstündigen Durchströmung durch die Milz solche Bakterien enthält, die in dem mit Sauerstoff durchströmten oder nur stehengelassenen Blute Bilirubinbildung hervorrufen würden.

Noch eine Möglichkeit muß in Betracht gezogen werden: nämlich daß die supponierten Bilirubinbakterien nur in dem Milzgewebe selbst Bilirubin erzeugen können. Diese Annahme wird aber durch die im nächsten Kapitel beschriebenen Versuche widerlegt. In diesen Versuchen hielten wir nämlich die Milz während 3 bis 4 Stunden ohne Blutdurchströmung in einem Thermostaten; die Durchströmung folgte erst dann nach der gewöhnlichen Art. In diesen Versuchen war keine Bilirubinbildung nachzuweisen, als Zeichen dessen, daß die Bilirubinbildung eine vitale Funktion der Milz ist. Die 3 bis 4 Stunden dauernde Asphyxie verringerte nämlich die Vitalität der Milz derart, daß die Bilirubinbildung ausgeblieben ist. Wäre die Bilirubinbildung ein durch Bakterien bedingter Vorgang gewesen, so hätte sich auch in diesem Versuch Bilirubin bilden müssen; denn die Bakterien in der Milz sind im Thermostaten aller Wahrscheinlichkeit nach nicht zugrunde gegangen.

II. Enthält die Milz auslaugbares Bilirubin?

Unter normalen Verhältnissen enthalten die Gewebe kein Bilirubin; es lagert sich erst bei Ikterus ab. Man sollte aber an jene Möglichkeit denken, daß die Milz eine geringe Menge Bilirubin — 2 bis 3 mg — eventuell doch enthält und dieses während der Blutdurchströmung aus dem Milzgewebe ausgelaugt wird und so in das Blut gelangt. Allenfalls müßte man da die Frage stellen: Wenn das Blut das Bilirubin aus der Milz auslaugt, warum geschieht dies nur in der isolierten Milz und nicht auch im lebenden Organismus? Ist in der Milz Bilirubin abgelagert, so muß man es auf irgend eine Art aus der Milz extrahieren und nachweisen können. In dieser Richtung führten wir folgende Versuche aus.

5. Versuch. 20. Dezember 1921.

Frische Hundemilz wurde verrieben und in drei Teile geteilt. Der erste Teil wurde mit der doppelten Menge physiologischer Kochsalzlösung verrieben und filtriert. Der zweite Teil mit 0,9 ccm NaCl-Lösung 4 Stunden lang geschüttelt, dann filtriert. Zu beiden Filtraten wurde je das vierfache Volumen Alkohol zugesetzt, dann filtriert. Das Filtrat enthielt kein Bilirubin. Der dritte Teil wurde mit der vierfachen Menge Alkohol 4 Stunden lang geschüttelt, dann filtriert. In dem Filtrat war kein Bilirubin nachweisbar.

6. Versuch. 22. Dezember 1921.

Die Ausführung war dieselbe wie im Versuch 5. Bilirubin war nicht nachzuweisen. Diese zwei Versuche zeigen, daß durch Kochsalzlösung oder Alkohol aus der Milz Bilirubin nicht zu extrahieren ist. In dem folgenden Versuch trachteten wir, das in der Milz supponierte Bilirubin mittels Durchströmung mit *Ringer*scher Lösung zu extrahieren.

7. Versuch. 7. Februar 1922.

Gewicht des Hundes 9,7 kg. Die isolierte Milz wurde von der Arteria lienalis aus mit 50 ccm *Ringer*scher Lösung durchspült und dann im *Brodie*schen Apparat mit 70 ccm Ringerlösung während 4 Stunden durchströmt. Wir konnten nach dem Versuch in der Ringerlösung kein Bilirubin nachweisen. Das Hilusfett der Milz war fahlgrau.

*Ringer*sche Lösung extrahiert also das in der Milz supponierte Bilirubin nicht; vielleicht weil die Ringerlösung nicht die nötigen physikalischen und chemischen Eigenschaften besitzt. Die Extraktion müßte daher mit Blut geschehen. In diesem Falle könnte man aber nicht entscheiden, ob Bilirubinbildung, also eine vitale Funktion, oder postmortales Auslösen des in der Milz abgelagert gedachten Bilirubins vor sich geht. Diese Frage wäre zu entscheiden, wenn man eine in seiner Vitalität stark geschädigte Milz mit Blut durchströmen läßt. Ist das Erscheinen des Bilirubins im Blute eine vitale Funktion, so muß es bei dem Durchströmen einer nicht mehr lebenden Milz ausbleiben, während das postmortale Auslösen sich an der nicht mehr lebenden Milz ebenso einstellt. Das Abnehmen oder Aufhören der Vitalität können wir leicht erreichen, wenn wir die Milz einige Stunden ohne Sauerstoffversorgung lassen.

8. Versuch. 10. Februar 1921.

Gewicht des Hundes 16 kg. Die isolierte Milz legten wir in eine mit körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Schale und spülten sie mit defibriniertem Blute von der Arteria lienalis durch. Danach ließen wir die Milz in der inzwischen abgekühlten Kochsalzlösung auf Zimmertemperatur 2 Stunden lang stehen. Nach 2 Stunden gaben wir die Milz in den *Brodie*schen Apparat und ließen sie auf Körpertemperatur mit 120 ccm Blut 4 Stunden lang durchströmen. Vor dem Versuch enthielt das Blut kein Bilirubin, nach dem Versuch war Bilirubin in Spuren vorhanden (Diazoreaktion sehr schwach positiv, Hammarstenreaktion negativ).

Das Fettgewebe war fahlgelb. In der zweiten Stunde des Versuchs bestimmten wir den Sauerstoffverbrauch der Milz nach *Barcrofts* Differentialmethode, um einen Maßstab zu gewinnen, wie weit noch die Milz als überlebend zu betrachten ist. Zur Ausführung dieser Bestimmung entnahmen wir je einem Seitenrohr der arteriellen wie venösen Leitung zur gleichen Zeit 1 ccm Blut und bestimmten die Differenz in deren Sauerstoffgehalt. Aus dieser Angabe und aus der Strömungsgeschwindigkeit des Blutes berechnet, war der Sauerstoffverbrauch der Milz pro Minute auf 0,23 ccm zu setzen. Das Gewicht der Milz betrug 62 g. Der Sauerstoffverbrauch von 1 g Milz war demzufolge pro Minute 0,0037 ccm. Über den normalen Sauerstoffverbrauch der Milz fanden wir keine Angaben. Der von uns gefundene Sauerstoffverbrauch ist viel kleiner als der Sauerstoffverbrauch in situ untersuchter ruhender Niere, Pankreas, Darm oder Speicheldrüse, aber beiläufig ebenso groß wie der Sauerstoffverbrauch ruhender quergestreifter Muskeln [nach *Barcroft* (3)]. Die Milz war also noch immer in ziemlich gutem, überlebendem Zustand; dies kann die geringe Bilirubinbildung erklären.

In den folgenden zwei Versuchen ließen wir die Milz noch längere Zeit ohne Sauerstoffversorgung stehen. Außerdem ließen wir sie nicht abkühlen, sondern erhielten sie auf Körpertemperatur auch während der Dauer der Asphyxie. Damit trachteten wir ein schnelleres Absterben der Milz zu erzielen, denn das Bedürfnis an Sauerstoff ist größer bei höherer Temperatur; der Mangel an Sauerstoff stellt sich früher und in höherem Grade ein und dies führt zu schnellerem Absterben. Es ist auch bei anderen überlebenden Organen bekannt, daß sie bei Körpertemperatur schneller absterben. So ist die Lebensdauer der isolierten quergestreiften Muskeln bei Zimmertemperatur viel länger als bei Körpertemperatur (4).

9. Versuch. 11. Februar 1922.

Gewicht des Hundes 22 kg. Die isolierte und durchspülte Milz legten wir in körperwarme Kochsalzlösung und hielten sie so 4 Stunden lang im Thermostaten. Dann spülten wir die Milz neuerdings durch, um die sich während des langen Stehens trotz der ersten Durchspülung gebildeten Blutgerinnsel zu entfernen. Wir untersuchten das zum Durchspülen verwendete Blut nach der Entleerung aus der Milz und fanden darin kein Bilirubin. Danach ließen wir die Milz während 4 Stunden mit 100 ccm Blut durchströmen. Im Blute ist weder am Beginn noch am Ende des Versuchs Bilirubin zu finden. Das Fettgewebe ist fahl, gelblichbraun und enthält kein Bilirubin. Der Sauerstoffverbrauch der Milz ist am Ende der zweiten Stunde der Durchströmung pro Gramm und Minute 0,0029 ccm.

10. Versuch. 17. Februar 1922.

Gewicht des Hundes 18 kg. Die Ausführung des Versuchs war dieselbe wie im 9. Versuch. Die Milz war aber nur 3 Stunden lang ohne O_2-Versorgung in körperwarmer Kochsalzlösung liegen geblieben. Das zweite Durchspülen, das in dem 9. Versuch durchgeführt war, war nicht notwendig. Die Durchströmung erfolgte 4 Stunden lang mit 100 ccm der üblichen Blutmischung. Im Blute war weder am Beginn, noch am Ende

des Versuchs Bilirubin nachzuweisen. Das Fettgewebe war fahlgelb, enthielt kein Bilirubin. Sauerstoffverbrauch der Milz pro Gramm und Minute 0,0027 ccm.

In dem 9. und 10. Versuch war der Sauerstoffverbrauch trotz der langen Dauer der Asphyxie noch groß genug. Die Milz war also noch nicht ganz abgestorben, sondern in überlebendem Zustande. Trotzdem erschien im Durchströmungsblut kein Bilirubin. Nach längerer Asphyxiezeit verliert also die Milz ihre Fähigkeit, dem sie durchströmendem Blute Bilirubin abzugeben. Dies ist aber kaum anders zu erklären, als daß das Abgeben von Bilirubin eine vitale Funktion der Milz ist. Diese Funktion ist gegen Mangel an Sauerstoff sehr empfindlich (s. vorhergehende Mitteilung). Nach längerer Asphyxie (wie sie in den Versuchen 9 und 10 bestand) hört sie völlig auf, trotzdem die Milz noch in überlebendem Zustande ist. Diese Tatsache steht nicht einzeln da, denn es ist bekannt, daß die feineren Funktionen auch anderer Organe gegen jede Einwirkung sehr empfindlich sind, während dasselbe Organ seine minderwertigen Funktionen zu derselben Zeit noch gut bestreitet. So ist die Sekretion der überlebenden Drüsen gewöhnlich schon beeinträchtigt, wenn die elementare Funktion des Sauerstoffverbrauchs noch gut erhalten ist.

Bilirubin erscheint also im Durchströmungsblut infolge von vitaler Funktion der Milz.

Der 9. und 10. Versuch bezeugen auch, daß die Bilirubinbildung nicht durch Bakterien bedingt ist. In der in dem Thermostaten gehaltenen Milz können sich die Bakterien noch besser vermehren. Wäre die Bildung des Bilirubins durch Bakterien verursacht, so hätte sie hier noch größer sein müssen als in den typischen Versuchen.

III. Wird Bilirubin außer der Milz auch in anderen Organen gebildet?

Es wäre sehr interessant gewesen, außer der Milz auch andere, dem retikuloendothelialen Apparat angehörende Organe zu untersuchen, nämlich Knochenmark und Lymphdrüsen. Dies ist aber wegen technischer Schwierigkeiten undurchführbar; so mußten wir uns auf die Untersuchung anderer, leichter durchströmbarer Organe, so der Niere und Lunge, beschränken. Von besonderem Interesse ist die Untersuchung der Lunge, weil *Eppinger* (5) für möglich hält, daß in der Erzeugung der Bilirubinämie bei Pneumonikern auch jene Bilirubinbildung eine Rolle spielt, die in der Lunge stattfindet.

Die Durchströmung der Niere bzw. der Lunge ist genau so wie diejenige der Milz im *Brodie*schen Apparat vorgenommen worden. Von den Milzversuchen sind wir nun im folgenden abgewichen. Eine Kanüle haben wir nur in die Arteria renalis bzw. pulmonalis eingeführt,

nicht aber in die entsprechende Vene. Das Blut floß frei aus der Vene heraus. Freilich war die Niere bzw. Lunge nicht in Kochsalzlösung gelegt, weil sich dann das Blut in letztere entleert hätte, sondern lag in einer kleinen, nach oben offenen Glasglocke, welche unten mit einem Tubus versehen war. Die Glocke war in einem Thermostaten angebracht, dessen Luft mittels nasser Watte feucht gehalten wurde. Auf dem Grunde der Glocke war eine durchlöcherte Porzellanplatte, darauf lag das zu untersuchende Organ. Das aus der Vene fließende Blut kam durch die Löcher der Porzellanplatte in den Tubus der Glocke und von dort durch eine Gummirohrleitung in das venöse Sammelgefäß. Die Durchströmung wurde mit defibriniertem Blute ausgeführt, dessen kleiner Teil wie in den Milzversuchen mit destilliertem Wasser hämolysiert gewesen war. Die Tabellen I und II zeigen die Ergebnisse der Versuche.

Tabelle I.

Nierenversuche.

Nr.	Datum 1921—1922	Gewicht des Hundes kg	Asphyxiezeit Min.	Blutmenge ccm	Versuchsdauer Std.	Bilirubingehalt des Blutes vor dem Versuch	Bilirubingehalt des Blutes am Ende d. Versuchs
1	20. XII.	10	3	80	4	—	—
2	3. II.	21	$3^1/_2$	100	4	—	—
3	7. II.	9,7	3	60	4	—	—
4	10. II.	16	3	80	5	—	—

Aus den Daten der Tabelle ist zu ersehen, daß in der überlebenden Niere kein Bilirubin gebildet wird.

In den Lungenversuchen haben wir nur die linke Lunge benutzt. Im ersten Versuch hat die Lunge viel Blut zurückgehalten, wahrscheinlich darum, weil im kollaborierten Lungengewebe die Zirkulation verhindert ist. Darum haben wir in den späteren Versuchen durch eine in die Trachea gebundene Kanüle mittels eines Atmungsapparates die Lunge künstlich ventiliert.

Es ist zu sehen, daß unter den sechs Versuchen nur in einem einzigen eine Bilirubinbildung beobachtet werden konnte. Aber auch in diesem einen Versuch ist Bilirubin nur in minimalen Spuren entstanden, so daß wir auch der überlebenden Lunge keine bilirubinbildende Fähigkeit zusprechen können.

Unsere Untersuchungen scheinen also darauf hinzuweisen, daß die extrahepatogene Bilirubinproduktion nur auf einzelne Organe (vielleicht nur auf die zum retikuloendothelialen Apparat gehörenden Organe) beschränkt ist. Daß aber die Bilirubinbildung in der Milz

Tabelle II.

Lungenversuche.

Nr.	Datum 1921–1922	Gewicht des Hundes kg	Asphyxiezeit Min.	Blutmenge ccm	Versuchsdauer Std.	Bilirubingehalt des Blutes vor dem Versuch	am Ende d. Versuchs
1	22. XII.	11	5	*	4	—	—
2	23. XII.	9	5	100	4	—	—
3	27. XII.	10	*	90	5	—	*Diazo* schwach +. In 100 ccm 0,1 mg Bilirubin
4	4. I.	8	6	110	$5^1/_2$	—	—
5	18. I.	20	7	150	4	—	—
6	13. II.	12	5	*	4	—	—

*) Daten wurden nicht aufgezeichnet.

selber tatsächlich nur in den Zellen geschieht, die zum retikuloendothelialen Zellenapparat gehören — wie dies allgemein angenommen wird —, das bedarf noch weiterer Beweise.

Zusammenfassung.

Die Bilirubinbildung in der überlebenden Milz ist nicht durch Bakterien bedingt.

Die Bilirubinbildung wird nicht durch eine Ausspülung des in der Milz abgelagert supponierten Bilirubins vorgetäuscht.

Wenn die Vitalität der überlebenden Milz abnimmt, dann bleibt die Bilirubinproduktion aus.

In der überlebenden Niere und Lunge entsteht kein Bilirubin.

Literatur.

1) *Ernst* und *Szappanyos*, diese Zeitschr. **157**, 16, 1925. — 2) *Retzlaff*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **34**, 181. — 3) *Asher-Spiro*, Ergebn. d. Physiol. **7**, 757, 1908. — 4) *Baglioni-Abderhalden*, Handb. d. biochem. Arbeitsmeth. **8**, 1, S. 382. — 5) *Hirschfeld-Eppinger-Ranzi*, Hepatolienale Erkrankungen, S. 222. Berlin 1920.

Untersuchungen über extrahepatogene Gallenfarbstoffbildung an überlebenden Organen.

III. Mitteilung:

Untersuchungen an der überlebenden Milz von mit Phenylhydrazin vergifteten Hunden.

Von

Z. Ernst und J. Förster.

(Aus der I. medizinischen Klinik der königl. ungar. Pázmány-Péter-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 17. Januar 1925.)

Die gute Wirkung der Splenektomie bei perniziöser Anämie und hämolytischem Ikterus deutet dahin, daß die Milz beim Entstehen dieser Erkrankungen eine wichtige Rolle spielt. Im Sinne der Auffassungen von *Klemperer* und *Hirschfeld* (1) hemmt die Milz bei perniziöser Anämie die Funktion des Knochenmarks, infolge Splenektomie aber bleibt diese Hemmung aus und die Funktion des Knochenmarks steigert sich. *Eppinger* (2) hingegen schließt auf Grund seiner Hämatinstoffwechseluntersuchung dahin, daß nach Splenektomie die Funktion des Knochenmarks nachläßt und die gute Einwirkung der Splenektomie eigentlich durch das Aufhören des gesteigerten Zerfalls der roten Blutkörperchen bedingt ist. Bei *Eppinger* nämlich gilt als Maßstab des Blutkörperchenzerfalls die Ausscheidung des Urobilinogens, und er fand, daß die gesteigerte Urobilinogenausscheidung nach Splenektomie auf den normalen Wert herabsinkt. Daraus folgt zweifellos, daß die gesteigerte Hämolyse durch die Milz verursacht wird. Seine Versuche geben aber noch keine Erklärung über die Frage, ob die gesteigerte Hämolyse selbst in der Milz oder auf ihre Fernwirkung in anderen Organen stattfindet. Darauf gibt uns der Versuch *H. v. d. Berghs* (3) Aufschluß, der eine direkte hämolytische Wirkung der Milz bei perniziöser Anämie feststellte. Er fand nämlich, daß bei perniziöser Anämie das Blut der Milzvene Hämoglobin und Hämatin enthält, das periphere Blut aber nicht, ferner daß der Bilirubingehalt des Blutes der Milzvene viel höher ist als der des peripheren Blutes. Bei perniziöser Anämie

besteht daher in der Milz eine hochgradige Hämolyse und aus dem frei gewordenen Hämoglobin bildet sich ebenfalls in der Milz Bilirubin. Die gleichen Verhältnisse wie bei der perniziösen Anämie fand *H. v. d. Bergh* bei mit Phenylhydrazin vergifteten Hunden. Die Milzvene enthielt auch hier in großer Menge Bilirubin, woraus er darauf schloß, daß die Milz eine hämolysierende und Bilirubin erzeugende Fähigkeit besitzt; doch konnte er diese Bilirubin erzeugende Fähigkeit nur bei den mit gesteigerter Hämolyse einhergehenden Erkrankungsformen nachweisen. Aus unseren früheren Versuchen erscheint es als sehr wahrscheinlich, daß die Milz auch unter normalen Verhältnissen Bilirubin erzeugt. Wir fanden nämlich, daß die blutdurchströmte, überlebende Hundemilz Bilirubin erzeugt. Die Untersuchungsmethode schien sehr geeignet zur Entscheidung dessen, ob bei den Anämien vom Typus der perniziösen Anämie (z. B. Phenylhydrazinvergiftung) die Bilirubin erzeugende Fähigkeit der Milz ansteigt. Zur Klärung dieser Frage führten wir folgende Versuche aus. Wir vergifteten Hunde mehrere Tage hindurch mit subkutan verabreichter 5proz. Lösung von Phenylhydrazin hydrochloricum[1]). Die Vergiftung wurde fortgesetzt, bis sich an dem Tiere ausgeprägte Anämie und Ikterus beobachten ließen, was gewöhnlich am fünften bis achten Tage der Fall war. Da entnahmen wir die Milz des Hundes und ließen sie in einem *Brodie*schen Apparat mit defibriniertem Blute durchströmen, ähnlich wie in unseren früheren Experimenten. Wir führten fünf Versuche aus, deren Daten in folgender Tabelle zusammengestellt sind.

Zu den einzelnen Versuchen müssen wir noch folgendes bemerken:

1. Versuch. Der Hund wurde 5 Tage lang behandelt. Er bekam im ganzen 10,5 ccm 5proz. Phenylhydrazin. Er zeigte schon am vierten Tage ausgeprägte Anämie. Der Versuch geschah am sechsten Tage, als sich schwacher Ikterus einstellte. Der Urin enthielt reichlich Bilirubin, das Blut aber nur in Spuren. Am Tage des Versuchs war der Hund sehr herabgekommen, er konnte kaum stehen. Nach der Entnahme des zur Durchströmung nötigen Blutes (etwa 150 ccm) durch die Carotis blieb die Herztätigkeit plötzlich aus. Da wurde die Milz möglichst rasch entfernt, mit defibriniertem Blute durchgewaschen, dann im *Brodie*schen Apparat durchströmt. Die Asphyxiezeit der Milz war ein wenig verlängert durch den Umstand, daß die Milz schon während der Präparation ohne Blutversorgung war. Doch schien dies die bilirubinerzeugende Fähigkeit nicht zu beeinflussen, denn bis zum Schluß des Versuchs *vermehrte sich der Bilirubingehalt des Blutes.* Die Zirkulation war ziemlich gut, pro Minute etwa 4 bis 5 ccm, das Fettgewebe war vor dem Versuch normal, danach fahlgelb koloriert.

[1]) Da diese Lsöung infolge ihrer sauren Reaktion große Schmerzen verursacht, ist es zweckmäßig, sie mit Natronlauge zu neutralisieren.

Nr.	Behandlung mit 5proz. Phenylhydrazinlösung	Hämoglobin und Erythrocytenzahl	Tag des Versuchs	Körpergewicht des Hundes kg	Asphyxiezeit Min.	Blutmenge ccm	Gewicht der Milz vor d. Versuch g	Gewicht der Milz nach d. Versuch g	Durchströmung ccm pro Min.	Versuchsdauer	Bilirubin in 100 ccm vor dem Versuch mg	Bilirubin in 100 ccm nach d. Versuch mg	Bilirubin in 100 ccm Differenz mg
1	1924 II. 23. 1 ccm		28. II.	12,0	11	150	—	105	4—5	4h 30′	minimal (Spuren, höchstens 0,2 mg)	2,0	1,8
	24. 1,5 ccm												
	25. 2 „												
	26. 3 „	45 Proz. Hglb.											
	27. 3 „												
2	II. 29. 2 ccm		6. III.	11,0	10	120	—	125	1—1,5	4h	0,6	0,6	—
	III. 1. 2 „												
	2. 3 „												
	3. 2,5 ccm	50 Proz. Hglb.											
	4. 3 „												
	5. 1 „	30 Proz. Hglb.											
	6.	25 Proz. Hglb. 3080000 Erythroc.											
3	III. 8. 1,5 ccm	72 Proz. Hglb.	15. III.	12,0	7	125	—	100	während 20′ 1, dann 4—5	4h 15′	0,85	1,7	0,85
	10. 2 „												
	11. 2 „												
	12. 2 „												
	13. 2 „												
	14. 2 „												
	15.	56 Proz. Hglb. 3500000 Erythroc.											
4	III. 15. 1,5 ccm		22. III.	12,0	4	150	115	166	12—15	4h	0,9	3,5	2,6
	16. 2,5 „												
	17. 2,5 „												
	18. 2,5 „												
	19. 2,5 „												
	20. 2,5 „												
	21.	35 Proz. Hglb.											
5	IV. 11. 3 ccm		17. IV.	16,0	5	170	130	195	12—15	4h	Spuren (höchstens 0,2 mg)	2,8	2,6
	12. 3 „												
	13. 3,5 ccm												
	14. 3,5 „												
	15. —												
	16. 3,5 „												

2. Versuch. Der verwendete Hund vertrug das Phenylhydrazin besser. Er bekam um 50 Proz. mehr und war am Tage des Versuchs trotz der hochgradigen Anämie in ziemlich gutem Zustand. Im dunkelbraunen Urin war Gallenfarbstoff reichlich, Urobilinogen in Spuren vorhanden. Das Blut enthielt gelöstes Hämoglobin und ziemlich viel Bilirubin. Es war auffallend — und wir bemerkten dies auch bei anderen mit Phenylhydrazin behandelten Hunden bei der Zählung der roten Blutkörperchen —, daß ein Teil der roten Blutkörperchen trotz starken Schüttelns in Klumpen agglutiniert war. Wegen der Agglutination konnte das Zählen der roten Blutkörperchen nicht exakt durchgeführt werden; deshalb sind die in der Tabelle angegebenen Zahlen als Minimalwerte zu betrachten, zu welchen eine unbestimmbare, den agglutinierten Blutkörperchen entsprechende Zahl zu addieren ist. Die Durchströmung war zu Beginn gut, doch sehr bald verschlimmerte sie sich infolge eines unbekannten Faktors derartig, daß die Milz während des ganzen Versuchs pro Minute durchschnittlich von nur 1 bis 1,5 ccm Blut durchströmt war. Der Milzgröße hatte eine Durchströmung von 6 bis 8 ccm entsprochen. Wahrscheinlich ist es dieser sehr schlechten Durchströmung zuzuschreiben, daß sich während des Versuchs *der Bilirubingehalt des Blutes nicht vermehrte*; die Milz war während des ganzen Versuchs in relativer Asphyxie, und infolgedessen war ihre Vitalität verringert. Wie wir es in früheren Versuchen zeigten, bildet eine Milz mit herabgesetzter Vitalität kein Bilirubin.

3. Versuch. Der Hund bekam etwa ebensoviel Phenylhydrazin wie der erste. Am Tage des Versuchs war mäßige Anämie, jedoch starker Ikterus vorhanden. Der Urin war dunkelbraun gefärbt, enthielt sehr viel Bilirubin und wenig Urobilinogen. Im Blute war kein gelöstes Hämoglobin, jedoch Bilirubin reichlich vorhanden. Das Fettgewebe ist deutlich gelb gefärbt, darin wenig Bilirubin nachweisbar. Die Durchströmung war bis zum Ende der ersten Stunde gut, ließ dann langsam nach und betrug nach einer halben Stunde nunmehr etwa 1 ccm pro Minute. Die Ursache der schlechten Durchströmung hatte diesmal im Apparat gelegen, da das Filterrohr durch kleine Fibrinfäden verstopft war. Nachdem der Apparat in Ordnung gebracht war, war das Durchströmen durch weitere 3 Stunden sehr gut, pro Minute 8 bis 10 ccm. Vielleicht ist es dieser zweiten, etwa 20 Minuten dauernden relativen Asphyxie zuzuschreiben, daß *die Bilirubinbildung auch bei diesem Versuch verhältnismäßig gering war.*

4. Versuch. Am Tage des Versuchs ist ausgeprägte Anämie und starker Ikterus vorhanden. Der Urin ist dunkel, enthält sehr viel Bilirubin. Auch im Blute ist reichlich Bilirubin vorhanden. Das Fettgewebe ist blaßgelb, enthält wenig Bilirubin. Die Dauer der Asphyxie ist kurz, Durchströmung während des ganzen Versuchs ausgezeichnet (12 bis 15 ccm pro Minute). Diesen zwei Umständen ist es zuzuschreiben, daß *der Bilirubingehalt des Blutes einen in den vorhergehenden Versuchen noch nie beobachteten hohen Wert erreichte.* Das Fettgewebe im Hilus der Milz ist nach dem Versuch dunkel, beinahe orangegelb.

5. Versuch. Am Tage des Versuchs war im Urin des Hundes sehr viel Gallenfarbstoff, im Blute Bilirubin bloß spurenweise nachzuweisen. Die Durchströmung war sehr gut, pro Minute 12 bis 15 ccm. *Der Bilirubingehalt des Blutes zeigte während des Versuchs eine starke Erhöhung.* Das Fettgewebe in dem Milzhilus war vor dem Versuch schwach rosa, am Ende des Versuchs stark gelb.

Aus diesen Versuchen ist ersichtlich, daß in zwei Fällen wegen der Mangelhaftigkeit bzw. der kurze Zeit bestehenden Störung der Blutversorgung sich Bilirubin überhaupt nicht oder nur in geringen Mengen bildete. In den weiteren drei Versuchen steigt die Bilirubinkonzentration während des Versuchs um 1,8 bis 2,6 mg pro 100 ccm.

Es ist nun die Frage, welchen Schluß wir aus den Resultaten unserer Versuche ziehen können in betreff der Frage, ob Phenylhydrazinvergiftung die Bilirubinproduktion der Milz steigert oder nicht. Dabei können wir die Versuche 2 und 3, bei welchen die Durchströmung unvollkommen war, außer acht lassen und nur die Resultate der Versuche 1, 4 und 5 in Betracht ziehen. In diesen drei Versuchen ist die Steigerung der Bilirubinkonzentration im Blute während der Versuche durchschnittlich etwa 2,2 mg, also das Zweifache des Wertes, den wir bei unseren früheren Normalversuchen beobachtet haben (im Durchschnitt etwa 1,1 mg). Bei der Berechnung der Bilirubinproduktion müssen wir außer der Konzentration des Bilirubins auch die Menge des Blutes in Betracht ziehen. Bei den gegenwärtigen Versuchen war die zur Durchströmung benutzte Blutmenge eine größere als bei den Versuchen mit normaler Milz. Während dort 80 bis 100 ccm Blut ausreichten, mußte hier die Durchströmung wegen der stark vergrößerten Milz mit 120 bis 170 ccm geschehen. Wenn wir demnach aus der Blutmenge und aus dem Ansteigen der Bilirubinkonzentration während des Versuchs den Wert der Bilirubinproduktion berechnen, ist ersichtlich, daß die normale Milz im Durchschnitt etwa 1,2 mg, die durch Phenylhydrazin vergiftete durchschnittlich etwa 3,2 mg Bilirubin erzeugt, also beiläufig das 2½fache des normalen Wertes. Diese Zahl ist aber als Minimalwert zu betrachten, denn die Differenz muß in Wirklichkeit größer sein. Es häuft sich nämlich nicht nur im Blute, sondern auch im Fette und im Milzgewebe Bilirubin auf. Da die Phenylhydrazinmilz viel größer ist als die normale, speichert sich darin auch viel mehr Bilirubin auf. Diesen Faktor in Zahlen auszudrücken, ist uns nicht möglich, doch in Betracht gezogen, daß laut der Bestimmungen in Versuch 4 (s. weiter unten) die Bilirubinkonzentration in der Milz beinahe dieselbe ist wie im Blute, ferner, daß die Phenylhydrazinmilz beiläufig um 60 bis 80 g schwerer ist als die normale, können wir den Mehrbetrag des in der Milz angehäuften Bilirubins beiläufig als den vierten Teil des insgesamt produzierten Bilirubins feststellen. Dies in Rechnung nehmend, können wir die Bilirubinproduktion der Phenylhydrazinmilz beiläufig auf das Dreifache der Bilirubinproduktion einer normalen Milz schätzen.

Die Frage ist nun, was die Ursache der gesteigerten Bilirubinproduktion ist?

Infolge der Phenylhydrazinvergiftung nimmt die Milz an Größe bedeutend zu. Besonders im Versuch 5 war die mächtige Vergrößerung der Milz auffallend, aber auch bei den drei anderen Versuchen war sie sehr groß, hyperämisch und von dunkelbläulicher Farbe. Das Gewicht konnte vor dem Versuch nicht festgestellt werden, denn das hätte die Dauer der Asphyxie verlängert. Während des Versuchs nimmt das Gewicht der Milz zu, weil dieselbe während der Durchströmung mehr oder weniger Blut zurückhält. Die durch die Milz zurückgehaltene Blutmenge kann festgestellt werden, wenn wir nach dem Versuch die im Apparat zurückgebliebene Blutmenge bestimmen. Was von der ursprünglichen Blutmenge fehlt, wurde — einige Kubikzentimeter Eintrocknungsverlust abgerechnet — von der Milz zurückgehalten. Leider sind diesbezügliche Aufzeichnungen nur für die Versuche 4 und 5 vorhanden, in welchen das Gewicht der Milz vor dem Versuch nach der angegebenen Weise berechnet, etwa 115 bzw. 130 g betrug. Das Gewicht der Milz normaler Hunde von gleichem Körpergewicht schwankt zwischen 30 bis 60 g. Die Milz wächst daher infolge Phenylhydrazinvergiftung auf das Zwei- bis Dreifache an. Die Milz eines mit Phenylhydrazin vergifteten Hundes erzeugt zwei- bis dreimal so viel Bilirubin wie die Milz eines normalen Tieres. Dies wird wahrscheinlich dadurch verursacht, daß die Milz des vergifteten Hundes zwei- bis dreimal größer ist als die eines normalen Tieres.

Es schien interessant zu untersuchen, wie groß die Bilirubinmenge ist, welche von der Milz eines mit Phenylhydrazin vergifteten Hundes *im ganzen* produziert wird. Diese Frage untersuchten wir im Versuch 4. Nach dem Versuch wurde nicht nur der Bilirubingehalt des Blutes, sondern auch der Milz und des mit dem Milzhilus zusammenhängenden Fettgewebes bestimmt. Der Bilirubingehalt des nach dem Versuch im Apparat zurückgebliebenen Blutes war 3,5 mg. Das Fett wog 30 g; dessen Bilirubingehalt wurde auf folgende Weise festgestellt. Das Fett wurde fein zerkleinert, davon 10 g mit heißem Aceton wiederholt extrahiert und die Extrakte vereint; die Gesamtmenge des Extrakts war 135 ccm. Aus dem Extrakt wurde durch Kühlen mit Salz-Eismischung der größte Teil des gelösten Fettes ausgefroren. Nach dem Filtrieren gaben wir zu 2 ccm Extrakt ½ ccm Diazolösung. Die Flüssigkeit färbte sich rosa, dabei wurde sie stark getrübt, da die noch gelösten Reste des Fettes durch den Zusatz der Diazolösung ausgefällt wurden. Um die Lösung einer kolorimetrischen Untersuchung unterwerfen zu können, mußte das Fett entfernt werden. Dies geschah, indem wir die Mischung mit 3,5 ccm Äther zusammenschüttelten und stehenließen; nach einiger Zeit teilte sich die Flüssigkeit in zwei Schichten; in eine untere rosafarbige, wässerige Schicht von etwa ½ ccm und eine obere, aceton-ätherische farblose Schicht von 5,5 ccm. In der letzteren war die ganze Menge des zurückgebliebenen Fettes gelöst. Nach Entfernung der oberen Schicht wurde die untere, welche das Diazobilirubin enthielt, mit Alkohol auf die ursprünglichen 2,5 ccm aufgefüllt und die Menge des Bilirubins kolorimetrisch bestimmt. Der so festgestellte Bilirubingehalt des Extrakts war 0,000 63 Proz. In den 30 g Fett waren

also 2,5 mg Bilirubin enthalten. Den Bilirubingehalt des Milzgewebes bestimmten wir auf gleiche Weise aus 10 g der fein zerriebenen Milz und fanden, daß die ganze Milz 4,7 mg Bilirubin enthält. Nach dem Versuch enthielten also die Milz, das Fett und das Blut insgesamt 10,7 mg Bilirubin. Aus dieser Menge wurde der Bilirubingehalt, welcher schon vor dem Versuch vorhanden war, abgerechnet. Dieser Wert kann nur durch Berechnung ermittelt werden, und zwar nahmen wir bei der Berechnung an, daß die Verteilung des Bilirubins im Blute einerseits, im Fettgewebe und in der Milz andererseits von der Bilirubinkonzentration unabhängig ist. Da der Bilirubingehalt des Blutes vor und nach dem Versuch bekannt ist, berechneten wir mit Hilfe obiger Annahme den Bilirubingehalt des ganzen Systems vor dem Versuch zu 2,8 mg. Während des Versuchs bildeten sich also in der Milz beiläufig 7,9 mg. Wie groß dieses Quantum ist, wird nur dann klar, wenn wir es mit jener Menge vergleichen, die während derselben Zeit durch die Leber eines gleich großen Hundes ausgeschieden wird. Ein Hund scheidet pro Kilogramm in einem Tage durchschnittlich 7 mg Bilirubin aus. Ein Hund von 12 kg also in 4 Stunden 16 mg, also nur doppelt soviel, wie die Phenylhydrazinmilz im Versuch 4 erzeugte. Natürlich sollte die Bilirubinproduktion der Phenylhydrazinmilz mit der Bilirubinausscheidung eines mit Phenylhydrazin vergifteten Hundes verglichen werden und nicht mit der eines normalen Tieres; doch war uns dies nicht möglich, da diesbezüglich keine Angaben vorhanden sind. Nach den Versuchen von *Ernst* und *Szappanyos* beträgt die durch eine normale Milz erzeugte Bilirubinmenge beiläufig den siebenten Teil der normalen Bilirubinausscheidung. Dies weist darauf hin, daß die Bilirubinproduktion der Milz keine zu vernachlässigende Größe ist, und daß sie sich bei den mit gesteigerter Hämolyse einhergehenden Prozessen stark erhöhen kann.

Zusammenfassung.

Die Bilirubinproduktion der überlebenden Milz wächst infolge der Phenylhydrazinvergiftung auf das Zwei- bis Dreifache der normalen Produktion.

Literatur.

1) *Klemperer* und *Hirschfeld*, Therapie der Gegenwart, S. 385. 1913. — 2) *Eppinger* und *Ranzi*, Die hepatolienalen Erkrankungen. Berlin 1920. — 3) *H. v. d. Bergh*, Der Gallenfarbstoff im Blute, S. 285. 1918.

Über das Vorkommen von Tryptophan in Seidenfibroin.

Von

Eikichi Hiratsuka.

(Aus dem Biochemical Laboratory of the Sericultural Experiment Station, Departement of Agriculture and Commerce, Tokio, Japan.)

(Eingegangen am 19. Januar 1925.)

Obgleich die Abbauprodukte des Seidenfibroins mehrfach von verschiedenen Autoren untersucht worden sind, so gibt es doch bisher noch keinen positiven Beweis dafür, daß Tryptophan darin enthalten ist. *Hubbard*[1]) war der erste, der darauf aufmerksam machte, daß der durch Pankreatin digerierte und mit Quecksilbersulfat gefällte Bestandteil der Seide eine positive Glyoxylsäurereaktion liefert. *O. Fürth*[2]) behauptete dagegen, daß Seidenfibroin entweder gar keine oder nur äußerst schwache *Voisenet*sche Tryptophanreaktion zeige, was offenbar auf Verunreinigung zurückzuführen sei.

Um diese Frage zu entscheiden, hat der Verfasser zuerst verschiedene Tryptophanreaktionen, und zwar die *Adamkiewiz*sche, die Glyoxylsäure- sowie die p-Dimethylamidobenzaldehydreaktion an Fibroin selbst ausprobiert und gefunden, daß sie alle positiv ausfallen. Dann hat er das Fibroin mit Baryt hydrolysiert und bestätigt, daß diejenige Fraktion, die durch Quecksilbersulfat gefällt wird, die obengenannten Proben sowie die Bromreaktion gab. Besonders stark waren sie mit den Fibroinen der wilden Seiden (Yamamai und Tussah). Schließlich hat er größere Mengen des Fibroins mit Baryt hydrolysiert und konnte tatsächlich das Tryptophan in reinem Zustande isolieren. Der Gehalt desselben war erheblich höher in den wilden Seiden als in der gewöhnlichen Zuchtseide. Die kolorimetrische Bestimmung nach *Herzfeld* bestätigte gleichfalls dieses Ergebnis.

---

[1]) *W. S. Hubbard*, Journ. Amer. Chem. Soc. **33**, 2032, 1911.
[2]) *O. Fürth* und *Fr. Lieben*, diese Zeitschr. **109**, 145, 1920.

Isolierung des Tryptophans.

Zu diesem Zwecke wurden 200 g Seidenfibroin in einem großen Rundkolben mit 650 g Ätzbaryt und 4000 ccm Wasser übergossen und unter Rückflußkühlung bei 103° 100 Stunden lang digeriert. Nach dem Erkalten wurde das Hydrolysat abgesaugt und mit heißem Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde samt dem Waschwasser durch Zusatz von Schwefelsäure vom Baryt befreit und unter vermindertem Druck eingedampft. Der größte Teil des Tyrosins schied sich dabei kristallinisch aus. Die Mutterlauge des Tyrosins wurde mit Wasser auf 100 ccm gefüllt und mit so viel Schwefelsäure versetzt, bis die Lösung 5 Proz. H_2SO_4 enthielt. Hierauf fügte man eine 10proz. Lösung von Quecksilbersulfat in 5proz. Schwefelsäure in Überschuß hinzu. Es entstand dabei ein gelber Niederschlag, der nach 24 Stunden abgesaugt und mit 5proz. Schwefelsäure gewaschen wurde. Der Niederschlag wurde dann in Wasser suspendiert, mit Baryt neutralisiert und unter Erwärmung durch Schwefelwasserstoff zerlegt. Man filtrierte nun vom Quecksilbersulfid ab; nach dem Vertreiben des Schwefelwasserstoffs dampfte man das Filtrat bei vermindertem Druck ein und gab so viel Schwefelsäure hinzu, bis sie 5 Proz. der Flüssigkeit erreichte. Es wurde jetzt mit einer 30proz. Phosphorwolframsäure im Überschuß versetzt, um die peptidartige Substanz zu entfernen, und nach 24 Stunden abfiltriert. Das Filtrat wurde nach Entfernung der überschüssigen Phosphorwolframsäure und der Schwefelsäure durch Baryt wiederum mit Schwefelsäure angesäuert, bis die Lösung 5 Proz. der Säure enthielt, und dann mit überschüssigem Quecksilbersulfat gefällt. Der Quecksilberniederschlag wurde wieder mit Schwefelwasserstoff zerlegt und abfiltriert. Das Filtrat davon wurde mit Baryt von Schwefelsäure befreit und nach dem Zusatz von wenig Alkohol im Vakuum eingedampft. Es schied sich das Tryptophan bald als weiße Kristallmasse aus, die aus 70proz. Alkohol umgelöst wurde.

Die Ausbeute betrug, auf 100 g Fibroin berechnet:

Gewöhnliche Zuchtseide . . .	0,6 g
Chinesische Tussahseide . . .	2,24 g
Yamamaiseide.	2,22 g

Aus heißem 70proz. Alkohol scheidet sich das Tryptophan in seidenglänzenden, sechsseitigen Tafeln aus. Es war *optisch inaktiv*, also d, l-Tryptophan. Es schmeckte süßlich und gab alle charakteristischen Reaktionen des Tryptophans. Im Kapillarrohr erhitzt, verfärbte es sich gegen 250° und schmolz bei 264°.

Die Analyse gab folgendes Resultat:

1. d, l-Tryptophan aus dem Fibroin der gewöhnlichen Zuchtseide.
   0,1284 g Substanz gaben 0,3034 g CO_2, 0,0708 g H_2O.
   0,1387 g Substanz gaben 23,12 mg NH_3 (nach *Kjeldahl*).

$C_{11}H_{12}O_2N_2$. Ber. 64,67 Proz. C, 5,93 Proz. H, 13,73 Proz. N;
gef. 64,47 „ C, 6,17 „ H, 13,70 „ N.

2. d, l-Tryptophan der Yamamaiseide.
0,1267 g Substanz gaben 0,3002 g CO_2, 0,0657 g H_2O.
0,2087 g Substanz gaben 34,513 mg NH_3 (nach *Kjeldahl*).
Gefunden 64,64 Proz. C, 5,80 Proz. H, 13,60 Proz. N.

3. d, l-Tryptophan der chinesischen Tussahseide.
0,1579 g Substanz gaben 0,3745 g CO_2, 0,0835 g H_2O.
0,2597 g Substanz gaben 42,667 mg NH_3 (nach *Kjeldahl*).
Gefunden 64,70 Proz. C, 5,92 Proz. H, 13,57 Proz. N.

d, l-Tryptophan-pikrat.

Wenn man die wässerige Lösung von Tryptophan mit einer äquivalenten Menge Pikrinsäure erwärmt, so erhält man das Pikrat als glänzende gelbe Nadeln, die in Alkohol leicht, in Äther und Wasser schwer löslich sind. Schmelzpunkt 195°.

0,1683 g Substanz gaben 23,88 mg NH_3 (nach *Kjeldahl*).
$C_{11}H_{12}O_2N_2 . C_6H_3N_3O_7$. Ber. 16,17 Proz. N; gef. 15,95 Proz. N.

Benzolsulfo-d, l-Tryptophan.

0,5 g Tryptophan wurden in n Natronlauge gelöst und mit 2,5 ccm Benzolsulfochlorid und 30 ccm n NaOH portionsweise und abwechselnd unter Schüttelung versetzt. Nach dem Verschwinden des Geruchs von Benzolsulfochlorid wurde das Reaktionsprodukt durch Zusatz von Eisessig gefällt und aus verdünntem Alkohol umkristallisiert. Es bildete farblose Nadeln vom Schmelzpunkt 189°, die in Alkohol leicht, in Äther und Wasser aber schwer löslich waren.

0,1684 g Substanz gaben 16,534 mg NH_3.
$C_{11}H_{11}O_2N_2SO_2C_6H_5$. Ber. 8,14 Proz. N; gef. 8,08 Proz. N.

β-Naphthalinsulfo-d, l-Tryptophan.

1 g Tryptophan wurde in n NaOH gelöst und mit einer ätherischen Lösung von 1,12 g β-Naphthalinsulfochlorid geschüttelt. Der dabei gebildete Niederschlag wurde in 20 ccm Wasser suspendiert, mit verdünnter Schwefelsäure angesäuert und mit gleicher Menge Äther im Scheidetrichter geschüttelt. Die ätherische Schicht wurde abgetrennt und zweimal mit Wasser gewaschen. Das dabei zurückgebliebene β-Naphthalinsulfo-d, l-Tryptophan wurde aus 70proz. Alkohol umkristallisiert. Es bildete farblose, sechsseitige Tafeln vom Schmelzpunkt 201°, die in Alkohol und Äther leicht, in Wasser schwer löslich waren.

0,4200 g Substanz gaben 35,394 mg NH_3.
$C_{11}H_{11}O_2N_2SO_2C_{10}H_7$. Ber. 7,11 Proz. N; gef. 6,93 Proz. N.

Kolorimetrische Bestimmung des Tryptophans.

Die Bestimmung des Tryptophans in Seidenfibroin wurde nach dem *Herzfeld*schen, von *Holm* und *Greenbank*[1]) modifizierten Verfahren ausgeführt. Das Prinzip dieses Verfahrens beruht auf der Entwicklung der blauvioletten Färbung, die durch Einwirkung von p-Dimethylamidobenzaldehyd auf Tryptophan in salzsaurer Lösung hervorgerufen wird. Man vergleicht die Intensität der Farbe kolorimetrisch (mit *Dubosq*schem Kolorimeter) mit einer Standardlösung, die eine bestimmte Menge Tryptophan enthält. Als Standard nimmt man gewöhnlich das Casein, welches nach *Hammarsten* dargestellt wird. Nach *Hopkins* und *Cole* enthält das *Hammarsten*sche Casein 1,5 Proz. Tryptophan, während *Holm* und *Greenbank* annehmen, daß es 2,24 Proz. enthält. So muß der beobachtete Wert des Tryptophans nach *Herzfeld*schem Verfahren große Abweichung zeigen, je nach der Annahme des Tryptophangehalts im Casein. Es genügt aber, um eine relative Menge desselben in verschiedenen Substanzen zu vergleichen.

Die Bestimmung wurde folgenderweise ausgeführt:

0,1 g Fibroin wurde in einem Gemisch von 40 ccm 30proz. Salzsäure und 2 ccm der 5proz. Lösung von p-Dimethylamidobenzaldehyd in 10proz. Schwefelsäure möglichst schnell unter Abkühlung gelöst, mit 10 ccm auf 0^0 abgekühltem Wasser verdünnt und 2 Tage bei 35^0 stehengelassen, wobei die blauviolette Farbe ihre maximale Intensität erreichte. Es wurde dann mit einer Standard-Caseinlösung, die gerade wie oben bereitet war, verglichen.

Die folgenden Zahlen wurden gefunden unter der Voraussetzung, daß das Casein 1,5 Proz. Tryptophan enthält.

Tryptophangehalt des Fibroins:

aus gewöhnlicher Zuchtseide	0,75 Proz.
„ Yamamaiseide.	2,86 „
„ chinesischer Tussahseide	4,14 „

Zusammenfassung.

Das Tryptophan wurde aus dem mit Baryt hydrolysierten Produkt des Seidenfibroins rein dargestellt. Der Gehalt hieran war erheblich höher in den wilden Seiden, wie Yamamai- und chinesischer Tussahseide, als in gewöhnlicher Zuchtseide. Die kolorimetrische Bestimmung nach *Herzfeld* bestätigte diesen Befund.

[1]) *G. E. Holm* und *G. R. Greenbank*, Journ. Amer. Chem. Soc. **45**, 1788, 1923.

Zellatmung.

II. Mitteilung:

Der Oxydationsmechanismus der Milchsäure.

Von

A. v. Szent-Györgyi.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 19. Januar 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In der ersten Mitteilung dieser Versuchsreihe[1]) habe ich mich mit der Oxydation der Bernsteinsäure beschäftigt. Der Zweck dieser Versuche war, festzustellen, wie sich an diesem klassischen Beispiele der biologischen Oxydation die Wasserstoffaktivierung zur Sauerstoffaktivierung verhält. Das Resultat dieser Versuche war, daß gezeigt werden konnte, daß sich an dieser Oxydation sowohl die Wasserstoff- als die Sauerstoffaktivierung beteiligen, daß beide in gleicher Weise unumgänglich nötig sind, daß bei dieser Oxydation der *aktive Wasserstoff* durch den *aktivierten Sauerstoff* verbrannt wird und die Oxydation durch das Ineinandergreifen beider Aktivierungsprozesse zustande kommt. In der Terminologie der Wasserstoffaktivierungstheorie heißt dies, daß der biologische Wasserstoffakzeptor der im *Warburg*schen System aktivierte Sauerstoff ist. Der molekulare Sauerstoff ist kein Wasserstoffakzeptor.

Durch die freundliche Zusendung eines Sonderabdrucks ist mir seither eine Arbeit aus dem *Hopkins*schen Laboratorium bekannt geworden, in der ihr Verfasser, *A. Fleisch*, u. a. über denselben reaktivierenden Einfluß des Methylenblaus bei Cyanvergiftung berichtete, der auch zum Teil die Grundlage meiner Arbeit bildete[2]). Die Kon-

---

[1]) Diese Zeitschr. **150**, 195, 1924. — Ich möchte die Gelegenheit benutzen, um einen sehr störenden Druckfehler dieser Arbeit zu korrigieren, der beim Lesen der Korrekturen damals leider stehen geblieben ist: in der letzten Zeile der S. 207 soll es heißen „unmißbar" an Stelle von „unmeßbar".

[2]) *A. Fleisch*, Biochem. Journ. **18**, 294, 1924. Diese Arbeit erschien ungefähr zur Zeit der Absendung meiner Arbeit, so daß ich sie, als mir unbekannt, in meiner ersten Mitteilung leider noch nicht berücksichtigen konnte.

klusion, zu der *A. Fleisch* an Hand dieses Versuchs gelangt, ist ebenfalls die, daß an der biologischen Oxydation der Bernsteinsäure sowohl eine Wasserstoff-, wie eine Sauerstoffaktivierung beteiligt ist.

Es liegen zahlreiche Gründe vor, um zu denken, daß dieser doppelte Verbrennungsmechanismus im wesentlichen wohl den ganzen großen Komplex der biologischen Oxydation charakterisiert. Bei dem Studium der Literatur der Wasserstoffaktivierung wird man sich wohl kaum des Eindrucks entziehen können, daß in der Wasserstoffaktivierung tatsächlich ein fundamentales Prinzip der biologischen Oxydation erkannt wurde. Auf der anderen Seite wird aber durch *Warburg* mit Recht betont, daß das Cyan die ganze Zellatmung vergiftet, und da diese Substanz wohl die Sauerstoffaktivierung, nicht aber die Wasserstoffaktivierung vernichtet, so müssen wir mit *Warburg* in der Sauerstoffaktivierung ebenfalls ein fundamentales Prinzip der Zellatmung erblicken.

So scheint es also, daß dieser, bei der Bernsteinsäure mit Sicherheit nachgewiesene doppelte Oxydationsmechanismus im wesentlichen die ganze Zellatmung charakterisiert. Im Falle der Bernsteinsäure sind beide Mechanismen an das unlösliche Plasmagerüst gebunden, was *Thunberg*[1]) auch für eine lange Reihe anderer Wasserstoffaktivierungsfermente, d. h. Dehydrasen zeigen konnte.

Immerhin haben aber Versuche, die ich vor etwa vier Jahren über die Funktion der Nebennierenrinde ausgeführt habe (unpubliziert), mich vermuten lassen, daß das Prinzip der biologischen Oxydation bei einem sehr wesentlichen Teile der Oxydationsprozesse durch das Eingreifen einer löslichen Substanz kompliziert sei, eine Vermutung, die für mich dann auch die Anleitung zu den Untersuchungen über den Mechanismus der Zellatmung war. Das erste untersuchte Beispiel, der Oxydationsmechanismus der Bernsteinsäure, ließ aber für eine derartige lösliche Substanz keine Rolle übrig. Die an das Plasmagerüst gebundene Wasserstoff- und Sauerstoffaktivierung ist auch ohne das Mitwirken einer löslichen Substanz wirksam, da, wie bereits *Battelli* und *Stern*[2])[3]) zeigten, auch der erschöpfend gewaschene Muskel die Bernsteinsäure mit großer Energie oxydiert.

Der angewiesene Weg für die weiteren Versuche war nun der, die Untersuchung auch auf den Oxydationsmechanismus anderer Substanzen auszubreiten, und zwar als weiteres Beispiel eine Substanz zu nehmen, von der — im Gegensatz zur Bernsteinsäure — wohl bekannt ist, daß sie im Wege des Zellstoffwechsels liegt und von der

---

[1]) *Th. Thunberg*, Skand. Arch. f. Physiol. **40**, 1, 1920.

[2]) *Battelli* und *Stern*, diese Zeitschr. **80**, 172, 1910.

[3]) *L. Stern*, Über den Mechanismus der Oxydationsvorgänge im Tierorganismus. 1914.

Zelle direkt oxydativ angegriffen wird. Die meist angewiesene Substanz schien hierfür die Milchsäure zu sein, von der wir heute mit Sicherheit wissen, daß sie im Zellstoffwechsel eine sozusagen zentrale Stelle einnimmt.

Durch die Arbeiten von *Thunberg* und *Warburg* waren die Grundlagen zu diesem Studium der Milchsäureoxydation bereits gegeben. *Thunberg*[1]) hat gezeigt, daß die tierischen Gewebe, namentlich der Froschmuskel für diese Säure eine recht aktive Dehydrase, d. h. ein Wasserstoffaktivierungsferment enthält, woraus konkludiert werden konnte, daß die Milchsäure durch die Zelle dehydrierend angegriffen wird. Andererseits konnte aus der generellen Wirkung des Cyans mit *Warburg* geschlossen werden, daß auch für die Oxydation dieser Substanz eine Sauerstoffaktivierung unumgänglich nötig sei. Das bei der Bernsteinsäure gefundene Prinzip des doppelten Oxydationsmechanismus schien also auch hier seine Gültigkeit zu haben.

Daß aber der Oxydationsmechanismus hier durch das Eingreifen einer dritten löslichen Substanz kompliziert sei, darüber finden wir bereits einige Angaben in einer der schönen Arbeiten *Meyerhofs*[2]) über die Atmung des Froschmuskels. *Meyerhof* findet namentlich, daß die Fähigkeit des Froschmuskels, Milchsäure unter Sauerstoffaufnahme zu oxydieren, durch erschöpfende Extraktion mit Wasser verloren geht. Daraus zieht er die Folgerung, daß die Oxydation der Milchsäure durch den Froschmuskel „wahrscheinlich" an die Anwesenheit eines Koferments gebunden ist, die er geneigt ist, mit dem Atmungskörper zu identifizieren; dieselben Versuche wurden später durch *W. Lipschitz*[3]) mit der Nitroreduktionsmethode mit demselben Resultat wiederholt.

Immerhin scheint es aber, daß in diesen Versuchen die Strenge der Beweisführung nicht mit der Tragweite der Konklusionen im Einklang steht. Erstens nämlich ist es recht gut denkbar, daß durch die Extraktion in diesen Versuchen nicht ein Koferment entfernt, sondern die Oxydationsfermente selbst ausgespült oder vernichtet wurden. Es wird später gezeigt, daß die Milchsäure-Dehydrase dem Waschen gegenüber tatsächlich recht empfindlich ist, daß also diese letzte Erklärungsmöglichkeit der obigen Versuche wohl recht auf der Hand liegt. Andererseits ist in der letzten Zeit durch Versuche von *H. F. Holden*[4]) aus dem *Hopkins*schen Laboratorium das Bestehen bzw. die Kofermentnatur des *Meyerhof*schen Atmungskörpers sehr zweifelhaft geworden. Diese Versuche scheinen mit Deutlichkeit zu zeigen,

[1]) *Th. Thunberg*, l. c.
[2]) *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **175**, 20, 1919.
[3]) *W. Lipschitz* und *A. Gottschalk*, ebendaselbst **191**, 1, 1921.
[4]) *H. F. Holden*, Biochem. Journ. **17**, 361, 1923; **18**, 535, 1924.

daß der Atmungskörper bzw. der Kochsaft des Muskels ihren reaktivierenden Einfluß auf die Atmung des gewaschenen Muskels nicht durch etwaigen Kofermentgehalt ausübt, sondern daß dieser Kochsaft im wesentlichen nur ein Gemenge extrahierter Brennstoffe darstellt. Der reaktivierende Einfluß des Kochsaftes auf den extrahierten Muskel ist demnach einfach derart zu deuten, daß dem, durch Extraktion seiner Brennstoffe beraubten Muskel mit dem Kochsaft nun seine Brennstoffe zurückgegeben werden. Auch kann *Holden* im Kochsaft keine kofermentartige Substanz nachweisen, die auf die Milchsäureoxydation einen aktivierenden Einfluß ausübt. Es sei vorausgreifend auch erwähnt, daß, soweit ich einige Versuche mit Kochsaft angestellt habe, diese in Übereinstimmung mit *Holden*, frei von Koferment für Milchsäureoxydation gefunden habe.

Die notwendige Beteiligung eines Koferments an der Oxydation der Milchsäure scheint nur dann erwiesen zu sein, wenn gezeigt werden konnte, daß der durch Extraktion inaktivierte Muskel durch das Zufügen des fermentfreien Extrakts in seiner Fähigkeit, Milchsäure unter Sauerstoffaufnahme zu oxydieren, reaktiviert werden kann. Es sei hier vorausgreifend kurz erwähnt, daß es mit derartigen Reaktivierungsversuchen tatsächlich auch gelingt, in einwandfreier Weise zu zeigen, daß *die Oxydation der Milchsäure durch das Muskelgewebe an die Anwesenheit eines Koferments gebunden ist.* Dieser Nachweis ist der Gegenstand vorliegender Arbeit.

Allgemeines über die Methodik.

Das Material der Versuche war das gewaschene Muskelgewebe, als Indikator der Prozesse diente der Sauerstoffverbrauch und die Methylenblauentfärbung nach *Thunberg*[1]).

Material. In einem kleinen Teil der Versuche wurde das Muskelgewebe der zahmen, bunten Ratte gebraucht (bei der weiteren Beschreibung der Versuche besonders angegeben). Das eigentliche Material der Arbeit war aber der Zwerchfellmuskel des Schweines.

Dieses Material, der Zwerchfellmuskel, hat besondere praktische und wahrscheinlich auch theoretische Vorteile. Der große praktische Vorteil ist der, daß durch das Entfernen dieses Organs keine größeren Muskelmassen beschädigt werden, weswegen der Schlächter dieses Material gern und billig abgibt, da hierdurch der Handelswert des Tieres nicht vermindert wird. Der theoretische Vorteil liegt in dem Umstande, daß in diesem Muskel der Oxydationsmechanismus besonders stark entwickelt zu sein scheint, worauf die durch *Vernon*[2]) in diesem Muskel gefundene besonders starke Indophenoloxydation hinweist, und ich habe auch den Eindruck gewonnen, daß in

[1]) *Th. Thunberg*, l. c.
[2]) *H. M. Vernon*, Journ. of Physiol. **43**, 96. 1911.

diesem Muskel die Milchsäure-Dehydrase dem Waschen gegenüber unempfindlicher ist, wie im Körpermuskel. Außerdem läßt sich dieser Muskel besonders leicht vom umgebenden Fett und Bindegewebe befreien, und die so gereinigten kräftigen, dicken Muskelbündel sind sozusagen fett- und sehnenfrei. Die Fettfreiheit ist bei diesen gemästeten Tieren ein nicht geringer Vorteil.

In allen Fällen wurde das Material so frisch wie möglich verarbeitet. Die Ratten wurden unmittelbar vor dem Versuch getötet und der Schweinemuskel wurde ebenfalls den soeben getöteten und geöffneten Tieren entnommen, dann vom unweit liegenden Schlachthause mit dem Fahrrade nach dem Laboratorium gebracht und sogleich der weiteren Verarbeitung unterzogen.

Die Verarbeitung des Materials war die folgende: Der Muskel wurde an einem Brette mit einem großen, scharfen Hackmesser mit raschen Bewegungen nach *Thunberg* weitgehend und gleichmäßig zerkleinert, und zwar bis zu einer gemittelten Teilchengröße von ungefähr 1 cmm. Dann wurde der Muskelbrei in der etwa 15fachen Menge eisgekühlten destillierten Wassers suspendiert und 15 Minuten in nicht zu raschem Tempo am Schüttelapparat geschüttelt. Dann wurde durch ein reines Tuch filtriert, ausgepreßt, nochmals in Wasser suspendiert, in gleicher Weise geschüttelt, filtriert und kräftig ausgepreßt. Dann wurde der Muskel nochmals kräftig zwischen Filterpapier in dünnerer Schicht ausgepreßt.

Hiernach wurde der Muskel mit der halben Gewichtsmenge von Glaspulver versetzt und dann in einem Mörser zerknetet. Mit Rücksicht auf die mögliche Wärmeentwicklung wurde nicht gerieben, sondern mit kräftigen, langsamen Bewegungen gestampft, bis die Muskelstückchen verschwanden bzw. weitgehend aufgefasert waren. Dies wird — wenn man nicht mit zu großen Muskelmengen arbeitet (etwa 10 g) — in 2 bis 3 Minuten erreicht. Das derartig gewonnene Material wird nun in einem Becherchen, gut bedeckt, zwischen Eis bewahrt. Die Bedeutung der Vorkühlung des Waschwassers wird später besprochen.

Die Feinheit des verwendeten Glaspulvers ist ein nicht unwesentlicher Faktor. Ein zu feines Pulver inaktiviert die Dehydrase der Milchsäure. (Andere Dehydrasen, wie z. B. die Succindehydrase, werden nicht geschädigt.) Darum wurde das Pulver erst durch ein seidenes Sieb mit Löchern von 0,25 qmm gesiebt, der grobe Rest verworfen, das Pulver dann gründlich durch ein Sieb mit Löchern von 0,085 mm gesiebt, und dann für die Versuche der Rückstand mit der Teilchengröße von 0,085 bis 0,25 mm Durchmesser benutzt.

Diese feinere Zerteilung des Muskels mit Glaspulver hat sehr große Vorteile. Durch diese Verteilung wird die Diffusion als unbekannter, in vielen Fällen vielleicht limitierender Faktor ausgeschaltet, und zwar in bezug auf alle verwendeten Faktoren: Sauerstoff, Milchsäure Kofermente usw.

Ganz unumgänglich nötig scheint diese feinere Zerteilung des Muskels bei den Dehydrierungsversuchen, wo Methylenblau als Indikator gebraucht wird. Arbeitet man nämlich mit gröberen Muskelteilchen, die man bloß durch Zerkleinerung mit dem Messer erhält, so wird man hauptsächlich die Wirkung der Fermente beobachten, die an der Oberfläche der Teilchen sitzt. Im Falle der Milchsäure sind diese Fermente aber eben an der Oberfläche der Teilchen durch das Waschen inaktiviert (oder weggespült), währenddessen das Innere der Teilchen noch sehr wirksame Dehydrasen enthält. So gibt dann die Methylenblauentfärbung unrichtige, mit den

aeroben Versuchen (wo Sauerstoffverbrauch gemessen wird) inkongruente Resultate. Außerdem ist die Entfärbung in dem mit Glas verteilten Muskel auch viel schärfer zu beobachten.

Die *Entfärbungsversuche* mit Methylenblau wurden bei 37° in den a. a. O.[1]) beschriebenen Thunbergröhrchen angestellt. Die abgewogene Muskelmasse wird in Form eines festen Klümpchens in das Röhrchen eingeführt und hier mit den betreffenden Flüssigkeiten überschichtet. Bei der Evakuierung schwillt das Klümpchen zu einer porösen Masse an, die sich dann durch Schütteln sehr gleichmäßig verteilen und mit der Flüssigkeit gründlich durchmengen läßt.

Der *Sauerstoffverbrauch* wurde im beiliegend abgebildeten (Abb. 1) *Respirometer* gemessen. In diesem Respirometer wurde der Muskel stets in 0,2 mol. Kaliphosphatlösung mit p_H 7,2 mit einem Glasstäbchen gleichmäßig suspendiert. Es wurden bei allen Versuchen stets zwei gleiche Apparate verwendet, die im Wasserbade (37°) dem Barcroftdifferentialmanometer angeschlossen wurden. Während der Versuche wurde stets mit einem Motor in horizontaler Richtung kräftig geschüttelt. Mit den Ablesungen des Sauerstoffverbrauchs wurde 10 Minuten nach Versenken der Apparate im Wasserbade begonnen.

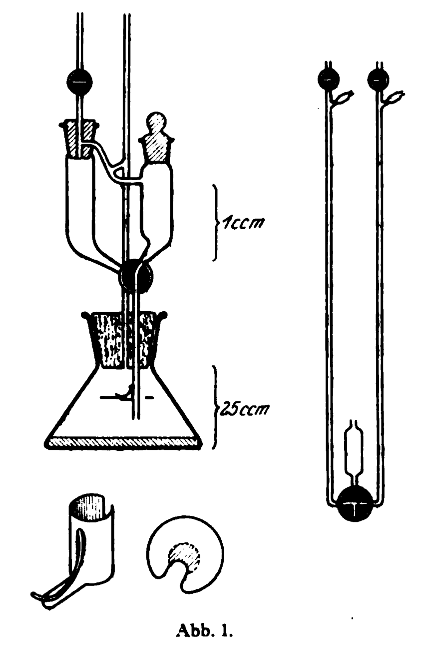


Abb. 1.

Das verwendete *Manometer* trägt in seiner Mitte einen *T*-Hahn, der zum Ölreservoir führt (s. Abb. 1). Während der Arbeit ist dieses Reservoir stets ausgeschaltet. Das Einschalten dieses Hahnes hat für die Füllung und Reinigung des Manometers große Vorteile. Natürlich muß dieser Hahn sehr genau geschliffen sein. Er wird nicht gefettet, sondern vor der Füllung des Manometers mit Glycerin befeuchtet.

Die *Kohlensäure* wurde in folgender Weise gebunden: Ein entsprechend ausgeschnittenes Stück dicken Löschpapiers (Abb. 1, C) wurde an seiner Mitte mit einem Tropfen geschmolzenen Paraffins befeuchtet. An dieser paraffinierten Stelle wird das Papierchen in der Klemme befestigt, die am Abflußröhrchen angebracht und in Abb. 1 B vergrößert wiedergegeben ist. Die peripheren Partien des Papieres werden mit starker Kalilauge befeuchtet (± 0,1 ccm). Die Bedingungen der Bindung der CO_2 sind an dem frei im Gefäß suspendierten Papier sehr günstig. Die gebildete CO_2 wurde nicht bestimmt, aber in Versuchen, wo dies nötig sein sollte, scheint mir dies mit dieser Methodik sehr leicht möglich. Es wird keine Schwierigkeiten geben, den CO_2-Gehalt des Papieres gasometrisch zu bestimmen.

[1]) Diese Zeitschr. **150**, 195, 1924.

Übersicht der Ergebnisse.

Die experimentellen Ergebnisse vorliegender Arbeit sind die folgenden: der in obiger Weise behandelte Muskel zeigt keinen oder einen nur spurenhaften Sauerstoffverbrauch. Wird dem Muskel Milchsäure (bzw. Na-Lactat) in neutraler Lösung in einer Konzentration von 0,05 bis 0,02 mol. zugesetzt, so wird hierdurch die stillstehende oder sehr geringe Sauerstoffaufnahme nicht gesteigert, als Zeichen dessen, daß der extrahierte Muskel nicht imstande ist, Milchsäure unter Sauerstoffaufnahme zu oxydieren[1]).

In diesem, durch Extraktion in seiner Milchsäureoxydation inaktivierten Muskel läßt sich mit der *Thunberg*schen Methylenblauentfärbungsmethode eine kräftige Milchsäurehydrase nachweisen. Der in seiner Milchsäureoxydation inaktivierte Muskel ist also imstande, den Wasserstoff der Milchsäure in energischer Weise zu aktivieren. d. h. die Milchsäure zu dehydrieren, vermag aber nicht den aktiven Wasserstoff zu oxydieren.

Der extrahierte Muskel ist stets imstande, Bernsteinsäure und *para*-Phenylendiamin kräftig zu oxydieren, als Zeichen dessen, daß in ihm neben der Dehydrierung auch das System oder wenigstens gewisse Systeme der Sauerstoffaktivierung ungestört vorhanden sind [vgl. erste Mitteilung[2])], und daß diese neben der Wasserstoffaktivierung der Milchsäure bestehen können, ohne daß es zu einer Oxydation des aktiven Wasserstoffs bzw. Reduktion des aktiven Sauerstoffs käme.

Der durch Extraktion inaktivierte Muskel kann durch Zufügung des Extrakts in seiner Fähigkeit, Milchsäure unter Sauerstoffaufnahme zu oxydieren, wieder reaktiviert werden. Der Extrakt selbst, ohne Muskel, ist nicht imstande, Milchsäure zu oxydieren, ist also ebenso inaktiv wie der Muskel ohne Extrakt. Das wirksame, den extrahierten Muskel reaktivierende Prinzip des Extraktes ist koktostabil, säurefest, kann aus seiner neutralen Lösung mit Bleiacetat niedergeschlagen werden und kann aus diesem Bleipräzipitat mit H_2S wieder in aktiver Form zurückgewonnen werden. Das aktive Prinzip, das ich im folgenden mit *Meyerhof* als Koferment bezeichnen werde, ist in 80 Proz. Aceton löslich, kann aber aus dieser Lösung mit Petroläther nicht ausgeschüttelt werden. Das Koferment wird in saurer Lösung durch protein-

[1]) Diese Feststellung steht im Widerspruch zu den Resultaten von *H. F. Holden* (Biochem. Journ. 18, 535. 1924), der findet, daß der auch energisch extrahierte Muskel wohl die Milchsäure unter Sauerstoffaufnahme oxydiert. Woran diese Diskrepanz unserer Resultate liegt, kann ich nicht sagen. Die Versuche *Holdens* sind auch nicht genügend zahlreich — wie ich ersehen kann, handelt es sich nur um einen Versuch —, um darüber ein Urteil zu bilden.

[2]) Diese Zeitschr. **150**, 195, 1924.

präzipitierende Mittel, wie Sublimat, nicht niedergeschlagen. Alle diese Befunde weisen darauf hin, daß wir im Koferment einen relativ einfachen Körper zu erblicken haben, der sich wahrscheinlich auch einer direkten chemischen Analyse nicht entziehen können wird.

Bei Anwesenheit undenaturierter Eiweißkörper des Muskels oder seines Extrakts wird das Koferment, wahrscheinlich durch eine Adsorption oder sonstige Bindung, rasch inaktiviert und scheint beim Kochen mit dem Eiweiß der Muskelfaser mit präzipitiert zu werden, welcher Eigentümlichkeit wahrscheinlich der Umstand zuzuschreiben ist, daß sich dieses Koferment bis jetzt der direkten Beobachtung entzog, und die auch die negativen Resultate von *Holden* bedingte.

Experimenteller Teil.

Die Dehydrase.

Methodik. 0,75 g des vorbehandelten Muskels (also 0,5 g reines Muskelgewebe + Glaspulver) werden in das Thunbergröhrchen eingeführt und hier mit 0,5 ccm Phosphatlösung und 0,25 ccm 1 : 2500 Lösung von Methylenblau med. und dann mit 0,25 ccm 0,2 mol. Natriumlactatlösung versetzt. In den Kontrollröhrchen wird an Stelle des Milchsäurezusatzes gleich starkes bernsteinsaures Natrium oder Wasser zugesetzt. Dann wird das Röhrchen geschlossen und der Wasserstrahlpumpe angeschlossen. Das Vakuum wird am zwischengeschalteten Manometer kontrolliert. Ist der Druck auf niedrige Werte gefallen, so wird das Röhrchen noch mit der Hand erwärmt, verschlossen, das ganze Röhrchen dann tüchtig durchgeschüttelt. Dann wird die Muskelemulsion durch energische Schüttelbewegungen im dünnen Teil des Röhrchens vereinigt. Sodann wird das Seitenrohr mit Wasser gefüllt, das ganze Röhrchen im Wasserbade (37°) versenkt und auf seine Farbe von Minute zu Minute beobachtet. Nach eingetretener Entfärbung wird das Röhrchen unter Wasser geöffnet, um sich zu überzeugen, daß das System gut evakuiert war und nach Öffnen des Hahnes sich bis auf ein kleines Luftbläschen mit Wasser füllt. Das Evakuieren plus Durchschütteln usw. bis zum Versenken im Wasserbade dauert durchschnittlich 1½ bis 2 Minuten.

Durch die beiden vorhergehenden Waschungen des Muskels von je 15 Minuten ist die Fähigkeit des Muskels, auch ohne Zusatz von Milch- oder Bernsteinsäure Methylenblau zu reduzieren, noch nicht ganz verschwunden. Wir werden im folgenden diese Fähigkeit des gewaschenen Muskels, Methylenblau auch ohne Zugabe von Brennstoffen (d. h. Wasserstoffdonatoren) zu reduzieren, mit *Thunberg* Restreduktion nennen. Der in beschriebener Weise vorbehandelte Muskel zeigt also eine deutliche Restreduktion und entfärbt den Farbstoff in 15 bis 60 Minuten. Gewöhnlich tritt die Entfärbung in 30 bis 45 Minuten ein. Durch die Zugabe von Bernsteinsäure oder Milchsäure an Stelle des Wassers wird diese Reduktionszeit stark verkürzt, und zwar tritt die Entfärbung bei Bernsteinsäurezusatz in etwa 3 bis 5 Minuten ein.

Bei Gebrauch von Milchsäure ist die Entfärbungszeit etwas länger, 3 bis 10 Minuten, meistens etwa 5 bis 10 Minuten. Dies beweist also, daß der gewaschene Muskel für die Milchsäure eine energische Dehydrase in hochaktiver Form enthält. Nicht zu selten findet man aber auch viel längere Entfärbungszeiten oder mißt selbst jede Beförderung der Entfärbung durch Milchsäure. Es kann also die Milchsäuredehydrase trotz aller Vorsichtsmaßregeln bei der Waschung oder sonstigen Vorbehandlung auch ganz vernichtet werden. Worauf dieses unerwartet auftretende Versagen der Präparierung zurückzuführen sei, konnte ich nicht bestimmen. Das einzige, was ich in diesen Fällen tun konnte, war, den Versuch mit der traurigen Feststellung abzubrechen, daß es nicht gelungen war, die Dehydrase in genügend aktiver Form zu präparieren. Die Möglichkeit derartiger negativer Versuche macht es dann auch nötig, alle weiteren Versuche über Reaktivierung durch Koferment usw. mit einem Entfärbungsversuch zu beginnen. Ist die Dehydrase bei der Vorbehandlung zugrunde gegangen, so sind doch alle weiteren Versuche ergebnislos und irreführend.

Es würde zu viel Raum in Anspruch nehmen, wenn ich alle Dehydrierungsversuche einzeln wiedergeben wollte. Darum möchte ich die Dehydrase bloß zusammenfassend beschreiben, so, wie sie mir auf Grund meiner Versuche erscheint. Als Ausgangspunkt möchte ich ihre Eigenschaften mit den Eigenschaften der bereits bekannteren Bernsteinsäuredehydrase in Parallele stellen. Die Methodik war bei allen Versuchen im Wesen die oben angegebene.

Die Bernsteinsäuredehydrase ist (dem destillierten Wasser gegenüber) „waschecht". Wiederholt man die Waschung nicht nur zwei, sondern auch noch ein drittes und ein viertes Mal und bestimmt dann die Aktivität der Dehydrierung, d. h. die Entfärbungszeit, so findet man diese praktisch unverändert. Sie wird nur etwas länger, ungefähr so viel, wie es der abnehmenden Restreduktion entspricht. Es macht auch keinen wesentlichen Unterschied, ob man die gewaschenen Muskel direkt, ohne weitere feinere Verteilung untersucht, oder ob man diesen mit Glaspulver vorher noch feiner verteilt, als Zeichen dessen, daß die äußere Fläche der Muskelteile ebenso aktive Dehydrase enthält, als ihr Inneres. Ebenso ist es auch nicht von Bedeutung, ob man das Waschwasser bei Zimmertemperatur verwendet, oder ob man das Waschwasser vorher in Eis auf 0^0 kühlt. Endlich kann man sein Muskelpräparat mit praktisch unbeschränkter Aktivität im Eisschrank aufbewahren, so lange es die eintretende Fäulnis zuläßt. *Thunberg* findet, daß man den Muskel in Borsäurelösung im Eisschrank wochenlang in aktiver Form bewahren kann, was ich gut bestätigen kann. Diese große Unempfindlichkeit der Dehydrase wird auch schon von *Batelli* und *Stern* hervorgehoben, die es auch nicht nötig finden, als Ausgangs-

substanz frischen Muskel anzuwenden. Auch die große Unempfindlichkeit dem Waschen gegenüber wird von ihnen bereits hervorgehoben.

Ein ganz anderes Verhalten zeigt die Milchsäuredehydrase in den parallel angestellten Versuchen allen genannten Faktoren gegenüber. An erster Stelle möchte ich den Einfluß der Temperatur des Waschwassers besprechen. Meine ersten Versuche waren am Rattenmuskel angestellt. Dieses Material zeigte nach zweimaligem Waschen mit ungekühltem Wasser in den meisten Fällen eine nur ganz schwache Dehydrierung, d. h. eine nur sehr geringe Verkürzung der Entfärbungszeit bei Milchsäurezusatz. Es war kaum zu denken, daß diese spurenhafte Dehydrierung der tatsächlichen Dehydrierung im ungewaschenen Muskel entsprach, oder aber mußte der Muskel die Milchsäure in anderer Weise als dehydrierend angreifen. Die Variierung der p_H des Waschwassers durch verschiedenen Phosphatzusatz, sowie die Variierung des osmotischen Druckes durch Salzzusatz verbesserte das Resultat nicht. Endlich wurde die Temperatur des Waschwassers variiert, d. h. das Waschwasser in Eis vorgekühlt. Während des Schüttelns war die Suspension zwischen Eis eingebettet, so, daß die ganze Vorbehandlung des Muskels bei 0^0 geschah. Der derart gewaschene Muskel ergab nun regelmäßig eine kräftige Dehydrierung, die in seiner Intensität nicht sehr weit hinter der Bernsteinsäuredehydrierung blieb oder diese gar erreichte.

Der Diaphragmamuskel des Schweines scheint der Temperatur gegenüber minder empfindlich als der Körpermuskel der Ratte, und gibt, bei Zimmertemperatur behandelt, auch oft recht aktive Präparate. Immerhin wurde auf Grund der günstigen Erfahrungen beim Körpermuskel der Ratte auch hier die Vorkühlung des Waschwassers eingeführt, was die Resultate doch deutlich günstiger gestaltete. (Bei diesem Material wurde das Wasser nur vorgekühlt, das Schütteln wurde ohne Eispackung vorgenommen.) Es sei erwähnt, daß die Extraktionskraft des Wassers den zu extrahierenden Wasserstoffdonatoren gegenüber durch die Kühlung praktisch nicht vermindert wird.

Auch die feinere Verteilung des Muskels durch Glaspulver wird, wie bereits erwähnt, auch durch diese Waschempfindlichkeit unumgänglich nötig. Untersucht man nämlich den nur mit dem Messer zerkleinerten, gewaschenen Muskel im Entfärbungsversuch, so findet man nur eine schwache Dehydrierung bzw. Entfärbung. Dasselbe Präparat zeigt dann, mit Glaspulver zerrieben, eine unverhältnismäßig stärkere Entfärbung als Zeichen dessen, daß die mit Waschwasser direkt in Kontakt stehende Oberfläche der Muskelstückchen ihr Ferment eingebüßt hat. Auch die Haltbarkeit des gewaschenen Muskelpräparats ist viel beschränkter als im Falle der Bernsteindehydrase. Untersucht man die Dehydrierung seines Präparats, das über Nacht

im Eiskasten gestanden hat, am folgenden Tage, so findet man diese sehr weitgehend abgeschwächt, wenn auch noch nicht ganz verschwunden. Praktisch ist aber sehr wichtig, daß man sein Präparat bei 0^{0} (zwischen Eis) einige Stunden gut bewahren kann, ohne daß die Dehydrierungskraft stark abnähme, was ermöglicht, daß man mit demselben Präparat eine Reihe von Versuchen vornehmen, d. h. mit dem am Morgen angefertigten Präparat , den ganzen Tag durcharbeiten kann[1]).

Wie erwähnt, ist aber auch die Extraktion mit vorgekühltem Wasser bei weitem nicht unschädlich. Bestimmt man die Entfärbungszeit nach der zweiten, dann nach einer dritten und vierten Waschung, so sieht man die Entfärbungszeit stets um etwa die Hälfte länger werden. Aus diesem Umstande läßt sich schließen, daß auch die unumgänglichen ersten zwei Waschungen nicht unschädlich waren und die Dehydrierungskraft bereits deutlich geschädigt haben, daß also die Dehydrierungskraft des ungewaschenen Muskels der Milchsäure gegenüber noch deutlich stärker ist als in unserem auch noch so vorsichtig zubereiteten Präparat. Da wir sahen, daß die Bernsteinsäuredehydrase durch das Waschen nicht beeinflußt wird, so können wir vermuten, daß im ungewaschenen Muskel die *Milchsäuredehydrase eine ebenso große, wenn nicht noch größere Intensität besitzt als die Bernsteinsäuredehydrase*, deren Intensität bis jetzt als einzig dastehend betrachtet wurde, und deren Aktivität wohl einen jeden überraschen mußte, der mit diesem Ferment Versuche angestellt hat.

Das Koferment.

Wie bereits erwähnt, ist der zweimal 15 Minuten lang gewaschene Muskel nicht imstande, Milchsäure unter Sauerstoffaufnahme zu oxydieren. Wird dem derart vorbehandelten Muskel Milchsäure zugesetzt, so wird die stillstehende oder sehr geringe Sauerstoffaufnahme nicht in Gang gesetzt oder gesteigert.

---

[1]) Der Umstand, daß die Dehydrase beim Waschen so viel schneller an der Oberfläche als im Innern der Muskelstückchen verloren geht, wie auch der Umstand, daß beim Waschen die Aktivität überhaupt so rasch abnimmt, währenddessen sich das Präparat in ausgepreßtem Zustande doch stundenlang gut erhalten läßt, scheint mir dafür zu sprechen, daß die Inaktivierung durch das Waschen eigentlich nicht durch ein Vernichten, sondern nur durch ein Wegspülen der Fermente bedingt wird. Es sei daran erinnert, daß so wie *E. Ohlsson* (Skand. Arch. f. Physiol. **41, 77, 1921**) und *E. M. P. Widmark* (Skand. Arch. f. Physiol. **41**, 200, 1921) finden, auch die Bernsteinsäurehydrase abgespült werden kann, wenn man an Stelle des Wassers Soda oder sekundäres Phosphat verwendet, die Waschechtheit dieses Ferments also auch keine wesentliche Eigenschaft darstellt.

Experiment. Die diesbezüglichen Versuche wurden oft unter verschiedenen Kombinationen wiederholt. In einem Teil der Versuche wird der Muskel (1,5 bis 3 g Muskelpräparat) in der doppelten Menge Phosphatlösung suspendiert, der Sauerstoffverbrauch bestimmt (im Kompensationsrespirometer nur Phosphat ohne Muskel). In einem zweiten Versuch wird nun der Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von 0,02 bis 0,05 mol. Natriumlactat nochmals bestimmt und mit dem Sauerstoffverbrauch des ersten Versuchs verglichen.

Im anderen Teil der Versuche wird der soeben beschriebene erste Versuch wiederholt, aber das eine Seitengefäß mit neutraler Milchsäurelösung gefüllt. Nachdem die Kurve des Sauerstoffverbrauchs ohne Milchsäure festgestellt wurde (5 bis 10 Minuten), wurde die Milchsäure in das Kölbchen zum Muskel eingelassen und dann die Sauerstoffaufnahme weiter verfolgt.

Beim dritten Typus der Versuche wird das Kölbchen beider Respirometer mit der Muskelphosphatemulsion versetzt, aber an der einen Seite wird auch noch Milchsäure zugefügt. Der Ausschlag des Manometers gibt nun das Plus des Sauerstoffverbrauchs an, der durch die Milchsäure bedingt war.

Alle diese Versuche ergaben dasselbe negative Resultat. Der extrahierte Muskel ist nicht imstande, Milchsäure zu oxydieren. Die entscheidende Frage war nun die, ob der extrahierte Muskel durch Zufügung des Extrakts reaktiviert werden kann? Es war natürlich nicht zu erwarten, daß das so verdünnte Waschwasser des Muskels diesen reaktivierenden Einfluß ausüben könnte. Es wurde also in folgender Weise ein konzentrierterer Extrakt hergestellt.

Extrakt. Der frische, vom Schlachthaus erhaltene Muskel wird in zwei Teile geteilt. Der eine Teil wird sogleich der bereits bekannten Präparierung unterzogen. Gleichzeitig wird der andere Teil mit dem Hackmesser soweit möglich zerkleinert, dann mit der gleichen Menge eisgekühlten destillierten Wassers gründlich durchgemengt. Diese Suspension wird nun $\frac{1}{2}$ bis $\frac{3}{4}$ Stunden lang unter wiederholtem Umrühren in Eis stehengelassen. Dann wird durch ein dichtes Leinentuch stark ausgepreßt und mit dem gewonnenen Filtrat und dem inzwischen fertiggestellten Muskelpräparate sofort der Reaktivierungsversuch vorgenommen.

Mit diesem Extrakt wurden nun Reaktivierungsversuche angestellt, die sich methodisch folgendermaßen gestalteten:

4 ccm Extrakt werden mit 2 ccm Kaliphosphat neutralisiert (p_H 7,2). Dann werden je 3 ccm dieser Flüssigkeit in das Kölbchen beider Respirometer eingeführt. In dem einen Respirometer werden nun im Extrakt 2 g Muskelpräparat suspendiert. Das eine Seitengefäß beider Respirometer wird mit 0,5 ccm 0,2 mol. Na-Lactat gefüllt, das Respirometer geschlossen und der Versuch begonnen.

Nachdem die Kurve des Sauerstoffverbrauchs 5 bis 10 Minuten lang verfolgt wurde, wird die Milchsäure eingelassen und 3 Minuten später die Ablesungen fortgesetzt.

Die vorher angestellten Kontrollversuche zeigen, daß der Extrakt allein, ohne Muskel, auch bei Gegenwart von Milchsäure keinen Sauerstoffverbrauch zeigt. Da aber der Extrakt reichlich Brennstoffe der

Zelle enthält, verbraucht das System Muskel plus Extrakt auch vor der Zufügung der Milchsäure stets nicht ungeringe Mengen Sauerstoff (3 bis 12 ccm per Minute).

In den derartig angestellten Versuchen konnte unter 20 unabhängigen Versuchen viermal eine deutliche Zunahme des Sauerstoffverbrauchs nach Milchsäurezugabe beobachtet werden. Die ersten zehn Versuche, die einmal ein positives Resultat ergaben, wurden am Rattenmuskel angestellt. Bei diesen ersten Versuchen wurde aber das Waschwasser des Muskelpräparats nicht in allen Versuchen vorgekühlt. Der eine positive Versuch aber, in dem eine Zunahme des Sauerstoffverbrauchs von 7,9 ccm O_2 auf 19,8 ccm O_2 beobachtet wurde, also eine Zunahme von ungefähr 150 Proz., schien deutlich zu beweisen, daß der Muskel durch den Extrakt reaktiviert werden kann.

Die Versuche mit Diaphragmamuskel ergaben das folgende Resultat: unter zehn Versuchen waren sieben negativ, drei positiv. Diese drei Versuche ergaben folgende Zahlen (Zahlen der 1. Kolumne bedeuten den O_2-Verbrauch in Kubikzentimetern pro Minute vor, Kolumne 2 nach der Milchsäurezugabe. Kolumne 3 gibt die Steigerung in Prozenten an):

5,9	11,8	100
3,0	7,4	150
5,1	8,1	60

Diese Versuche ließen wenig Zweifel daran übrig, daß die Milchsäureoxydation des gewaschenen Muskels durch den an und für sich unwirksamen Extrakt reaktiviert werden kann. Aber ebensowenig konnte ein Zweifel bestehen, daß die Umstände der Extraktion außerordentlich ungünstig waren.

Der erste Eindruck, den diese Versuche gaben, war der, daß wir es im aktiven Prinzip des Extrakts mit einer außerordentlich labilen Substanz zu tun haben, die selbst unter den schonenden Bedingungen der Extraktion zugrunde ging. Noch stärker wurde der Eindruck, als in den positiven Versuchen auch das sehr rasche Inaktivwerden des eisgekühlten Extrakts beobachtet werden konnte.

Die mühsamen Versuche, die Bedingungen zu verbessern (Luftabschluß, sehr sorgsame Kühlung, geringe Variierung der p_H nach beiden Seiten), schienen nichts zu helfen, die Resultate schienen im Gegenteil stets noch schlechter zu werden, je vorsichtiger die Arbeit fortgesetzt wurde.

Der Ausweg aus dieser Schwierigkeit wurde endlich durch die Erkenntnis gefunden, daß dieses Inaktivwerden des Extraktes nicht durch das Zugrundegehen des Koferments bedingt war, sondern durch die sehr starke Neigung dieser Substanz, sich an die Eiweiße der Muskelsubstanz oder die Eiweiße des Extrakts zu binden. Mit dieser Er-

kenntnis war nun der Weg des weiteren raschen Fortschritts geöffnet. Es würde zu viel Raum in Anspruch nehmen, alle Versuche einzeln zu besprechen, und ich möchte mehr nur die Resultate übersichtsweise behandeln, nachdem ich nochmals kurz die Methodik dieser späteren Reaktivierungsversuche beschrieben habe.

Methodik. Der in verschiedener Weise gewonnene und vorbehandelte Extrakt wird im Verhältnis 4 : 1 mit molarer Kaliphosphatlösung versetzt. Die zuzufügende molare Kaliphosphatlösung bestand aus primärem oder sekundärem Phosphat, je nachdem der Extrakt es erforderte, um endlich ein p_H von 7,2 zu erreichen.

Die Kölbchen der beiden Respirometer werden nun mit je 3 ccm dieser Mischung beschickt, dann werden in das eine Kölbchen 0,15 ccm mol. Natriumlactat, in das andere ebensoviel Wasser eingeführt. Nun werden in beiden Kölbchen in der Flüssigkeit 1,5 g des Muskelpräparats suspendiert, das Respirometer geschlossen und der Versuch in üblicher Weise fortgesetzt. Der Ausschlag des Manometers ergibt also bei dieser Aufstellung das Plus an Sauerstoffverbrauch, das durch die Oxydation der Milchsäure bedingt wird. Enthält der Extrakt kein Koferment, so wird an beiden Seiten dieselbe Sauerstoffmenge verbraucht, und das Manometer zeigt keinen Ausschlag.

Die weiteren in dieser Weise angestellten Versuche ergaben folgende Resultate: Hat man ein in obiger Weise bereitetes aktives Präparat in der Hand, so wird dieses beim Stehen (1/4 bis 2 Stunden) inaktiv. Wird hingegen das frische, noch aktive Präparat rasch bis zum Sieden erwärmt und die präzipitierenden Eiweißkörper abgetrennt, so verliert der Extrakt seine Aktivität nicht. Eher zeigt der klare, praktisch eiweißfreie Extrakt eine deutlich erhöhte Wirksamkeit. Dieser gekochte, eiweißfreie Extrakt kann dann auch stundenlang ohne Verminderung seiner Wirksamkeit aufbewahrt werden. Wird in derselben Weise ein inaktiv gewordener oder primär inaktiver Extrakt gekocht, so kehrt die einmal verlorene Wirksamkeit nicht zurück.

Wird der aktive, aufgekochte, eiweißfreie Extrakt mit Salzsäure versetzt, bis er freie Salzsäure enthält, und dann aufgekocht, so behält er seine Wirksamkeit. Das Koferment ist also auch in Gegenwart von Salzsäure koktostabil. Wird der vorher noch ungekochte, stark eiweißhaltige aktive Extrakt in Gegenwart von Salzsäure gekocht, so verringert er seine Wirksamkeit, wahrscheinlich durch den hemmenden Einfluß der unter Wirkung der Säure entstandenen Derivate der Eiweißstoffe.

Der aktive Extrakt kann in salzsaurer Lösung mit Sublimat enteiweißt werden. Das überschüssige $HgCl_2$ kann mit H_2S entfernt werden. Bei dieser Enteiweißung sieht man die Wirksamkeit des Extrakts ebenfalls deutlich zunehmen, was im Einklang mit den obigen Versuchen für einen starken hemmenden Einfluß der anwesenden Eiweißstoffe spricht.

Das Koferment kann aus dem enteiweißten Extrakt mit Bleiacetat bei neutraler Reaktion (Lackmus) niedergeschlagen und aus dem Präzipitat durch H_2S in aktiver Form zurückgewonnen werden.

War nun die Richtung zur Reinigung und Konservierung gefunden, so war noch die Extraktion eine sehr unvollkommene, da sie nur relativ selten aktive Extrakte ergab. Es wurde also versucht, die lange kalte Extraktion zu vermeiden, bei der dem Koferment zu viel Zeit für eine Adsorption an die Eiweißstoffe gegeben war, und den mit destilliertem Wasser versetzten Muskelbrei direkt aufzukochen, also einen sogenannten Kochsaft zuzubereiten, auf den sich auch die meisten Angaben *Meyerhofs* beziehen. Dieser Kochsaft wurde aber inaktiv gefunden. Scheinbar wird das Koferment beim Kochen an die präzipitierende Muskelmasse gebunden.

Stand nun einmal die Nichteiweißnatur und chemische Resistenz des Koferments fest, so konnten auch andere Extraktionsmittel als Wasser versucht werden. Es wurden dann tatsächlich auch mit 80 Proz. Aceton (das Aceton des Extrakts wurde dann bei vermindertem Druck abdestilliert) recht aktive Extrakte erhalten, wieder aber überwogen weitaus die negativen Resultate.

Diese negativen Resultate konnten kaum anders als mit einer Adsorption oder sonstigen Bindung des Koferments an die Eiweißstoffe erklärt werden. Diese starke Neigung, mit Eiweiß derartige Bindungen zu geben, schien mir für den basischen Charakter des Koferments zu sprechen und gab Anleitung, zu versuchen, die Extraktion in stark saurem Medium auszuführen, in dem die Amine stark dissoziierende Salze bilden und das Eiweiß einen kathodischen Charakter annimmt. Dem stand nichts im Wege, da doch die Säurefestigkeit des Koferments bereits fest stand. Ein sehr großes Hindernis bei dieser Arbeit war aber die enorme Schwellung der Muskelsubstanz bei Säurezugabe. Es wird durch das Muskelgewebe das zugegebene Wasser bzw. die Salzsäurelösung in kurzer Zeit gänzlich gebunden, und man kann keinen Extrakt mehr gewinnen. Es wurde versucht, dieser Schwierigkeit derart Herr zu werden, daß der Muskel, der zu gleichen Teilen mit 0,4 n HCl versetzt wurde, nach einem Stehen von 20 Minuten mit dem vierfachen Volumen Aceton versetzt, eine halbe Stunde stehengelassen und dann ausgepreßt wurde. Hierbei wird die Schwellung des Muskels durch das Aceton zurückgedrängt. Das Filtrat wurde mit Petroläther ausgeschüttelt. Durch den Petroläther wird kein Koferment entfernt, hingegen läßt sich von dem Rest, der nunmehr auch nur wenig Säurehämatin enthält, das Aceton gut abdestillieren. In dieser Weise wurden wiederholt recht aktive Extrakte erhalten. Das Resultat war nun viel günstiger, doch noch nicht konstant, und die ganze Methode zu kompliziert.

Hingegen zeigte sich, daß die große Schwierigkeit, die durch das Schwellen der Muskelmasse bedingt wird, sich durch Kochen überwinden läßt, wenn man nicht stärker als n/10 HCl verwendet. Zwar zeigt sich auch bei dieser Zugabe ein sehr lästiges Schwellen, aber bei höheren Temperaturen beginnt eine Entwässerung, so daß man endlich doch einen Extrakt auspressen kann, der an Volumen der zugesetzten Flüssigkeit gleichkommt. Wohl enthält die Flüssigkeit leider keine freie Salzsäure mehr, aber der erreichte Säuregrad scheint doch die Bindung, d. h. Inaktivierung des Koferments sehr wesentlich zu hemmen. Diese Extraktion gibt beinahe regelmäßig wirksame Präparate, deren Aktivität durch Enteiweißung mit $HgCl_2$ oft noch deutlich gesteigert werden kann.

Um die Manipulation also kurz zusammenzufassen: der frische, fein zerkleinerte, eventuell noch mit gleichen Teilen Quarzsand zerriebene Muskel wird mit gleichen Teilen n/10 HCl versetzt, einige Zeit erst stehengelassen (15 bis 30 Minuten), oder eventuell auch ohne Stehenlassen gleich unter starkem Rühren bis zum Kochen erwärmt (am besten wird die Suspension in dicken Reagenzgläsern für 5 Minuten in siedendes Wasser getaucht), dann rasch abgekühlt, ausgepreßt, das ganze Filtrat mit einer heißen konzentrierten Sublimatlösung versetzt, bis keine weitere Präzipitierung mehr eintritt. Dann wird zentrifugiert. Die klare Flüssigkeit wird mit H_2S von Quecksilber befreit, die klare Flüssigkeit bei vermindertem Druck im Luftstrom von H_2S befreit. Dann wird neutralisiert und im Reaktivierungsversuch auf Wirksamkeit untersucht.

Derartige Filtrate zeigten beinahe regelmäßig eine Aktivität, die öfters nur recht schwach, öfters aber auch recht ansehnlich war. Der Muskel verbrauchte in diesen Versuchen zur Oxydierung der Milchsäure pro Gramm Muskel 1,6 bis 6 ccm O_2 in der Minute.

Diese Präparierungsmethode ist vom Ideal noch weit entfernt, und es ist weitere Arbeit nötig, um die definitive, optimale Präparierungsmethode anzugeben, die dann auch die direkte chemische Analyse des Koferments ermöglichen wird. Es ist aber aus diesen Versuchen deutlich, daß sich diese Methode in der angegebenen Richtung wird bewegen müssen und das Arbeiten mit stark sauren Reaktionen bei der Extraktion eine Vorbedingung des Erfolges ist.

Es sei erwähnt, daß die stärkste Reaktivierung im Laufe der verschiedenen Präparierungen stets mit den Bleiacetat-Präzipitaten erreicht wurde. Unter den beiden diesbezüglichen Versuchen verbrauchte der Muskel zur Oxydation der Milchsäure in einem Falle 16,5 ccm O_2 pro Gramm Muskelgewebe in der Minute. Dieser starke O_2-Verbrauch ist sogar dem O_2-Verbrauch des frischen, unextrahierten Muskels überlegen. Diese starke Wirkung ist vielleicht auch dem Umstande zuzu-

schreiben, daß das Bleipräzipitat auch milchsäurefrei und im allgemeinen an Brennstoffen arm ist. Es ist natürlich, daß man mit den Extrakten, die stets Milchsäure enthalten, keine maximalen Reaktivierungen, d. h. Steigerungen des O_2-Verbrauchs erreichen kann, wenn man auch noch künstlich dieselbe Säure zusetzt.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß das Oxydationssystem der Milchsäure im Muskelgewebe aus einem löslichen, und einem relativ unlöslichen Teile besteht. Dieser letztere besteht aus einer hochaktiven Dehydrase und außerdem möglicherweise noch aus einem Sauerstoffaktivator. Die lösliche Substanz ist ein „Koferment", ist koktostabil, ist kein Eiweiß und kein Ferment. An und für sich ist sowohl der lösliche wie der unlösliche Teil inaktiv. Durch die Kombination beider Teile kann die Milchsäureoxydation bis zu ihrer normalen Intensität reaktiviert werden.

Die Arbeit beschäftigt sich eingehender mit den Eigenschaften der Dehydrase und des Koferments.

Zellatmung.

III. Mitteilung:

Reaktivierungsversuch mit künstlichen Kofermenten.

(Fortsetzung.)

Von

A. v. Szent-Györgyi.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 19. Januar 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

In der vorhergehenden Mitteilung wurde gezeigt, daß das System der Milchsäureoxydation aus einem unlöslichen und einem löslichen Anteil, einem Koferment besteht. Der unlösliche Anteil besteht im Wesen aus einer stark aktiven Dehydrase und außerdem noch möglicherweise aus einem Sauerstoffaktivator. Dieser unlösliche Anteil wird durch das lösliche Koferment zu einem wirksamen Ganzen ergänzt. Es scheint mir sehr bedeutungsvoll, in den intimeren Mechanismus dieses Oxydationsprozesses einen tieferen Einblick zu gewinnen, und es scheint mir auch keinem Zweifel zu unterliegen, welchem Wege die Analyse in dieser Richtung folgen muß: Will man eine sichere Einsicht in diesen Oxydationsmechanismus gewinnen, so soll das Koferment isoliert, seine chemische Konstitution ermittelt und dann die chemischen Veränderungen festgestellt werden, denen das Koferment im Laufe der verschiedenen Phasen des Oxydationsprozesses unterliegt. Aus diesen Veränderungen wird sich dann die Funktion des Koferments und hiermit auch der Mechanismus des ganzen Oxydationssystems der Milchsäure mit Sicherheit feststellen lassen. Diese Aufgabe scheint wohl schwierig, aber keineswegs unerreichbar zu sein.

Zweifelsohne kann ein sicheres Resultat nur eine solche direkte Analyse geben. Vor der Aufnahme dieser Arbeit schien es mir aber doch lohnend, zunächst einige künstliche Reaktivierungsversuche anzustellen, in denen versucht wurde, das Koferment in seiner Funktion durch chemisch bereits bekannte Substanzen zu ersetzen, um durch diese Versuche vielleicht doch einige Anhaltspunkte über die Funktion des Koferments zu erlangen, die möglicherweise auch die oben entworfene Arbeit erleichtern könnten.

Wie ich denke, wurde diese Erwartung nicht enttäuscht. Wie im voraus zu erwarten war, haben diese Versuche keine definitive Antwort über die Funktion des Koferments erbracht, haben aber zu einigen Beobachtungen geführt, die für die weitere Analyse sehr wertvoll erscheinen. Bei allen diesen Versuchen diente als fester Ausgangspunkt die in vorhergehender Arbeit gewonnene, mit *Wieland* und *Thunberg* übereinstimmende Anschauung, daß die Milchsäure bei ihrer Oxydation an erster Stelle unmittelbar durch das Wasserstoffaktivierungsferment dehydrierend angegriffen wird.

Mit dieser Anschauung läßt sich auch der ganze Oxydationsprozeß in seiner theoretischen Deutung weitgehend einschränken. Wir wissen also, daß das erste Glied in der Reihe der Reaktionen die Aktivierung des Wasserstoffs der Milchsäure sei. Um die Wasserstoffaktivierung in Gang zu erhalten, muß der aktivierte Wasserstoff dann von der Milchsäure bzw. Dehydrase durch einen sogenannten Wasserstoffakzeptor übernommen werden. Die auf die Wasserstoffaktivierung folgende Phase des Oxydationsprozesses muß also aus der Übernahme des aktivierten Wasserstoffs durch einen Wasserstoffakzeptor bestehen. Mit dieser Übernahme des Wasserstoffs ist aber die Oxydation der Milchsäure selbst abgelaufen, und die nachfolgenden Phasen des Oxydationsprozesses bestehen bloß aus dem weiteren Werdegang des Wasserstoffs, von dem wir wissen, daß er endlich an Sauerstoff gebunden als Wasser unter den Endprodukten der Reaktion erscheint.

Wir können also den ganzen Oxydationsprozeß der Milchsäure in zwei große Abschnitte trennen: 1. die Aktivierung des Wasserstoffs — dies ist das Werk der Dehydrase — und 2. den weiteren Werdegang des Wasserstoffs. Von diesem zweiten Abschnitt wissen wir, daß er mit der Übernahme des Wasserstoffs durch einen Wasserstoffakzeptor beginnt und durch die Bildung von H_2O endet, und daß bei dieser zweiten Phase des Oxydationsprozesses auch unser Koferment seine Rolle finden muß, und daß diese Rolle also auch aus irgend einer Vermittlung der Vereinigung des Wasserstoffs mit dem Sauerstoff bestehen muß.

Ob bei dieser zweiten Phase auch noch andere Elemente oder Systeme als unser Koferment eine Rolle spielen, läßt sich mit Sicherheit noch nicht sagen. Jedenfalls können wir, ausgehend von den Untersuchungen *Warburgs*, nach einem System der Sauerstoffaktivierung suchen. Daß das Koferment selbst der Sauerstoffaktivator sei, ist in hohem Maße unwahrscheinlich. Eher müssen wir die Sauerstoffaktivierung auch im unlöslichen Teile des Muskelgewebes suchen, von dem es auch wohl mit Sicherheit bekannt ist, daß er zu einer sehr intensiven Aktivierung des Sauerstoffs befähigt ist, wie sich dies durch die Oxydation der Bernsteinsäure und des p-Phenylendiamins nach-

weisen läßt[1][2]). Sicher steht auch, daß der in derartigen Systemen aktivierte Sauerstoff — wahrscheinlich wegen der räumlichen Trennung der Elemente — nicht mit dem aktiven Wasserstoff der Milchsäuredehydrase zu reagieren vermag. In diesem Falle würde dem Koferment eben die Rolle übrigbleiben, diese fest an das Plasma gebundenen Systeme der Wasserstoff- und Sauerstoffaktivierung zu einem wirksamen Ganzen zu komplettieren. Die chemisch sehr einfach vorstellbare Funktion des Koferments wäre dann die, den aktivierten Wasserstoff der Milchsäure zu übernehmen und dem System der Sauerstoffaktivierung zur Oxydation zu überbringen. Mit anderen Worten würde das Koferment einen Körper darstellen, der durch den aktiven Wasserstoff reduziert, durch den aktiven Sauerstoff oxydiert wird. Derartige Substanzen sind der biologischen Literatur nicht fremd und werden mit dem Namen „Wasserstofftransporteur" bezeichnet. Die große Bedeutung derartiger Wasserstofftransporteure für die Pflanzenphysiologie ist durch *W. Palladin* nachgewiesen. Nach *Hopkins* soll das Glutathion auch einen derartigen Wasserstofftransporteur darstellen[3]).

Wie ich denke, spricht auch das experimentelle Material vorliegender Arbeit zugunsten dieser Auffassung.

Experimenteller Teil.

1. Reaktivierungsversuche mit Katalase.

Wie erwähnt, ist also unser Ausgangspunkt der, daß die Milchsäure primär durch die Dehydrase angegriffen wird. Der aktivierte Wasserstoff muß dann durch einen Wasserstoffakzeptor von der Dehydrase übernommen werden und endlich durch Sauerstoff zu Wasser oxydiert werden. Die theoretisch denkbare allereinfachste Form des Systems wäre die, daß der molekulare Sauerstoff der Luft selbst diesen primären Wasserstoffakzeptor darstellt und direkt den aktivierten Wasserstoff

---

[1]) Diese Zeitschr. **150**, 195, 1924.

[2]) *A. Fleisch*, Biochem. Journ. **18**, 294, 1924.

[3]) Nach *W. Palladin* ist z. B. das Hydrochinon ein derartiger Wasserstofftransporteur, der durch die Oxydase zu Chinon oxydiert, dann durch die Zellen wieder zum Hydrochinon reduziert wird. Näheres siehe noch S. 78. Die Reaktionsgleichung ist die folgende:

OH O OH

→ →

OH O OH

zu Wasser oxydiert. Mit anderen Worten würde also der aktive Wasserstoff einfach einer Autoxydation unterliegen. Anlehnend an die Anschauung *Wielands* über Cyanvergiftung ließ sich diese Auffassung mit den beobachteten Tatsachen derart in Einklang bringen, daß wir annehmen, daß das Koferment die Katalase sei. Wird die Katalase weggespült, dann kann das bei der Autoxydation des aktiven Wasserstoffs primär entstandene Wasserstoffperoxyd nicht mehr entladen werden und vergiftet den weiteren Oxydationsprozeß.

Die Koktostabilität des Koferments ist natürlich ein bindender Beweis gegen diese Auffassung bzw. die Katalasenatur des Koferments. Außerdem aber konnte gezeigt werden, daß ein selbst dreimal gewaschener Muskel Katalase in genügender Menge enthält, um zugesetztes Wasserstoffperoxyd quantitativ in außerordentlich rascher Weise zu entladen, bevor es zu einer Schädigung der Dehydrase kommen könnte. Zufügung von Katalase — hämolysierte Blutkörperchen — kann auch das Koferment bei der Milchsäureoxydation nicht ersetzen.

Dieses negative Resultat besagt also, daß der aktivierte Wasserstoff keiner Autoxydation unterliegt, und ist eine Bestätigung der in der ersten Mitteilung[1]) entwickelten Anschauung, daß der molekulare Sauerstoff kein Wasserstoffakzeptor sei.

2. *Reaktivierungsversuche mit Methylenblau.*

Um das Oxydationsschema um eine Stufe verwickelter zu gestalten, könnten wir es theoretisch so vorstellen, daß der aktive Wasserstoff nicht direkt einer Autoxydation unterliegt, sondern von der Dehydrase erst durch einen intermediären Wasserstoffakzeptor übernommen wird und nun, an diesen gebunden, der Autoxydation unterliegt. Um das durch Waschen inaktivierte System zu reaktivieren, müßten wir ihm in diesem Falle eine Substanz zusetzen, die durch den aktiven Wasserstoff reduziert wird, an der Luft aber einer Autoxydation unterliegt, indem sie durch den Sauerstoff zur Ausgangssubstanz oxydiert wird.

Der angewiesene Stoff hierfür war das Methylenblau, das in ganz analoger Weise auch das cyanvergiftete System der Bernsteinsäureoxydation zu reaktivieren vermag[2])[1]). Daß das Methylenblau vom aktiven Wasserstoff der Milchsäuredehydrase reduziert wird, stand wohl auch durch die vorhergehende Mitteilung fest. Die große Autoxydabilität des Leucomethylenblaus ist wohl bekannt.

---

[1]) Diese Zeitschr. **150**, 195, 1924.

[2]) *A. Fleisch*, Biochem. Journ. **18**, 294, 1924.

Ich möchte der Kürze halber auch auf diese Versuche nicht näher eingehen. Ich möchte nur erwähnen, daß auch dieses System der Reaktivierung versagte. Die durch Waschen inaktivierte Milchsäureoxydation konnte durch Methylenblau nicht in Gang gesetzt werden.

Meine Versuche scheinen dafür zu sprechen, daß der Grund des Versagens des Methylenblaus als Reaktivator mit Wahrscheinlichkeit in der giftigen Wirkung der bei der Autoxydation des Methylenblaus intermediär entstehenden Peroxyde zu suchen sei, die die so außerordentlich empfindliche Milchsäuredehydrase beschädigen. Es sei daran erinnert, daß die Katalase auf monosubstituierte Peroxyde nicht einzuwirken vermag, und daß *A. Fleisch*[1]) ein ähnliches Versagen des Methylenblaus bei der Reaktivierung der cyanvergifteten Citronensäureoxydation beobachten konnte.

3. Reaktivierungsversuche mit Glutathion.

Sobald die Beteiligung einer koktostabilen, löslichen Substanz an der Oxydation der Milchsäure feststand, war die erste Frage die: Ist das Koferment nicht identisch mit dem Glutathion? Im Glutathion kennen wir doch nach den klassischen Untersuchungen von *Hopkins* und *Dixon*[2])[3]) einen Stoff, der durch die Zelle mit Leichtigkeit reduziert wird, andererseits mit großer Leichtigkeit der Autoxydation unterliegt, den *Hopkins* und *Dixon* selbst als einen Wasserstofftransporteur ansehen, von dem also *a priori* angenommen werden konnte, daß er die vermutete Rolle des Koferments der Milchsäureoxydation spielen kann, und von dem wohl auch mit Sicherheit angenommen werden kann, daß er im Zellstoffwechsel eine sehr hervorragende Rolle spielt, und der die meisten physischen und chemischen Eigenschaften, soweit ersichtlich, mit unserem Koferment gemein hat. Zwar sagen *Hopkins* und *Dixon*[3]), daß das Glutathion mit keinem bekannten Oxydationssystem in Verbindung gebracht werden konnte, tun aber der Milchsäure keiner besonderen Erwähnung. Dies berechtigte nun, das Glutathion in bezug auf die Oxydation der Milchsäure zu untersuchen, und zwar begnügte ich mich mit Rücksicht auf die große biologische Bedeutung des Objekts nicht mit der bloßen Feststellung, ob das Glutathion den unlösbaren Teil des Milchsäureoxydators zu reaktivieren vermag, sondern trachtete, mir durch die eingehendere Untersuchung der hypothetischen Phasen der Glutathionwirkung über diese Substanz ein tiefergehendes Urteil zu verschaffen. Diese Phasen seiner Funktion wären seine Reduktion durch den aktivierten Wasserstoff und seine

---

[1]) *A. Fleisch*, Biochem. Journ. **18**, 294, 1924.
[2]) *F. G. Hopkins*, Biochem. Journ. **15**, 286, 1921.
[3]) *F. G. Hopkins* und *M. Dixon*, Journ. of biol. Chem. **54**, 527, 1922.

Oxydation durch den Sauerstoff, namentlich durch dessen molekulare oder aktivierte Form. Mein Resultat war ein durchaus negatives. Es konnte gezeigt werden, daß das Glutathion durch den aktivierten Wasserstoff der Milchsäure nicht reduziert werden kann, daß die reduzierte Form nicht oxydiert wird, weder durch den molekularen Sauerstoff, noch durch seine aktivierte Form. Dementsprechend zeigte sich das Glutathion im Reaktivierungsversuch auch vollkommen inaktiv.

Diese Versuche mit Glutathion wurden zu Ende des Sommers 1924 abgeschlossen. Seither sind mir zwei neue Arbeiten aus dem *Hopkins*schen Laboratorium bekannt geworden, in denen über mit den meinen identische Versuchsergebnisse berichtet wird. Die erste ist aus der Feder von *H. F. Holden*[1]) wahrscheinlich im Laufe des Sommers erschienen. Aus den Versuchen geht die Feststellung hervor, daß das Glutathion kein Koferment der Milchsäureoxydation sein kann. Die zweite seither erschienene Arbeit von *D. C. Harrison*[2]) enthält die so wichtige Feststellung, daß das Glutathion an und für sich nicht autoxydabel sei, also spontan keiner Oxydation unterliegt.

Hiermit ist auch im Wesen unsere Frage über das Glutathion beantwortet. Wenn ich hier doch noch ausführlicher über meine diesbezüglichen Versuche berichte, geschieht dies aus dem Grunde, weil sie doch noch einige neue Angaben enthalten, und weil ich denke, daß sie wenigstens als Bestätigung der Befunde des *Hopkins*schen Laboratoriums auch nicht ganz wertlos sein werden.

Anlehnend an *Hopkins* wurde das Glutathion folgendermaßen präpariert: 15 kg Rinderleber, die 24 Stunden im Kühlraum des Schlachthauses aufbewahrt waren, wurden in der Hackmaschine zerkleinert, mit 10 Litern Wasser aufgekocht, ausgepreßt, dann noch einige Stunden lang kalt mit 5 Litern Wasser extrahiert. Dann wurde mit Bleiacetat gefällt, das Präzipitat mit Schwefelsäure zersetzt, mit Baryt und Phosphorwolframsäure gereinigt. Die so erhaltene Flüssigkeit wurde nochmals mit Bleiacetat gefällt und zur weiteren Präparierung das Filtrat verwendet (4 Liter). Das Bleipräzipitat wurde nicht weiter verarbeitet. Aus dieser Lösung wurde das Glutathion an Stelle des *Hopkins*schen Quecksilbersulfats in essigsaurer Lösung mit Sublimat gefällt. Die Quecksilberverbindung wurde in etwa 200 ccm Wasser mit H_2S zersetzt. Diese Lösung diente dann als Material der weiteren Versuche. Nach Entfernung des H_2S im Wasserstoffstrom verbrauchte 1 ccm der Lösung 0,25 ccm n/10 Jod. Die Disulfidform wurde nach Neutralisation durch Durchleiten von Luft bis zum Verschwinden der Nitroprussidreaktion erhalten. Dieses Disulfid ließ sich durch H_2S auch in saurer Lösung glatt in die reduzierte Form bis zum ursprünglichen jodometrischen Titer zurückführen.

---

[1]) *H. F. Holden*, Biochem. Journ. 18, 535, 1924.
[2]) *D. C. Harrison*, ebendaselbst 18, 1009, 1924.

Ich möchte noch erwähnen, daß ich viel Mühe verwendet habe, um die *Hopkins*sche Methode zu verbessern. Die Veränderungen der *Hopkins*schen Methode erwiesen sich aber stets als Verschlechterungen, so daß als einziges Resultat dieser Bemühungen außer einer besseren Kenntnis des Materials bloß ein starker Respekt der *Hopkins*schen Arbeit gegenüber übrigblieb.

Über die *Reaktivierungsversuche* möchte ich summarisch nur so viel erwähnen, daß sie stets negativ ausfielen. Weder die reduzierte, noch die oxydierte Form des Glutathions waren imstande, die Milchsäureoxydation des gewaschenen Muskels zu reaktivieren.

Auch die Frage der *Reduktion* des Glutathions durch den aktivierten Wasserstoff der Milchsäure möchte ich nur kurz berühren. Die Methodik dieser Versuche bestand im wesentlichen darin, daß das in üblicher Weise vorbehandelte Muskelpräparat (s. Mitteilung II) mit verschiedenen Mengen oxydierten Glutathions versetzt und dann in den *Thunberg*schen Röhrchen in vacuo verschieden lange bebrütet wurde. In Übereinstimmung mit *Hopkins* wurde gefunden, daß das Glutathion durch den Muskel stets in geringem Maße reduziert wird[1]). Es wurde darauf geachtet, daß dieses reduzierte Glutathion stets nur einen geringen Teil des anwesenden Dipeptids ausmachen konnte. Parallel wurden dieselben Versuche bei Gegenwart von Milchsäure ausgeführt. Hierbei zeigte sich, daß die Milchsäure nicht imstande ist, die Reduktion des Glutathions zu fördern, daß also der aktivierte Wasserstoff der Milchsäure nicht imstande ist, die oxydierte Form des Glutathions zu reduzieren. Dasselbe war auch der Fall mit der Bernsteinsäure[2]).

Die Versuche über die *Autoxydation* des Glutathions wurden in folgender Weise angestellt:

Das Kölbchen beider Respirometer wird mit je 2 ccm Phosphatlösung versetzt. Zur Phosphatlösung des einen Respirometers wird nun noch so viel n NaOH (0,13 ccm) zugesetzt, wie zur Neutralisation von 1 ccm meiner sauren Glutathionlösung nötig war. Das eine Seitengefäß desselben

---

[1]) Nur in einem Punkte sind meine Resultate hier von den *Hopkins-Dixon*schen (Journ. of biol. Chem. 54, 527, 1922) Angaben abweichend. Diese Forscher finden nämlich (S. 536), daß das oxydierte Glutathion durch das fixe SH der Muskel reduziert wird. Ich fand hingegen, daß die Nitroprussidreaktion des Muskels (Fix SH) nach Verweilen des Muskels in überschüssigem oxydierten Glutathion nicht vermindert. Der Versuch von *Hopkins* und *Dixon* kann auch derart gedeutet werden, daß das fixe SH durch das Peroxyd oxydiert wurde, das bei der Autoxydation des Glutathions entstehen mußte. Dieser Punkt scheint mir wohl eingehenderer Untersuchung wert.

[2]) Selbstverständlich muß man sich bei allen derartigen Versuchen in Kontrollexperimenten davon überzeugen, daß das Muskelpräparat eine aktive Milchsäuredehydrase enthält (Methylenblauentfärbungsversuch nach *Thunberg*).

Respirometers wird nun mit 1 ccm meiner 0,025 mol. reduzierten Glutathionlösung (jodometrisch gemessen) versetzt. Nachdem das derart gefüllte Respirometer, im Wasserbade (37°) stets geschüttelt, in 10 Minuten seine Temperaturkonstanz erreicht hat, wird das Glutathion in das Kölbchen eingelassen und 1 Minute später die Ablesung der Druckdifferenzen am Differentialmanometer begonnen. Die Druckdifferenzen werden dann um die Minute 15 Minuten lang notiert. Nach Ablauf dieser Zeit wird der Inhalt des Kölbchens kolorimetrisch (Nitroprussidnatrium) und jodometrisch auf seinen Gehalt an unoxydiertem Glutathion untersucht und das Resultat dieser Messungen mit der Gasmessung verglichen. Von diesen titrimetrischen und kolorimetrischen Messungen sei nur so viel erwähnt, daß ihr Resultat mit dem Resultate der Gasmessungen stets in guter Übereinstimmung stand.

Der Sauerstoffverbrauch eines solchen Versuchs ist in Abb. 1 durch Kurve Aqu. I wiedergegeben. Der Pfeil oben bedeutet die zur quantitativen Oxydation des Glutathions rechnerisch benötigte Sauerstoffmenge.

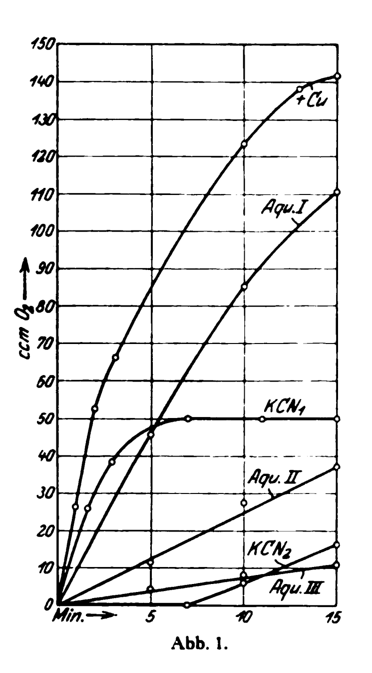


Abb. 1.

Man sieht, daß in Übereinstimmung mit *Hopkins* und *Dixon* das Glutathion einer raschen Autoxydation unterliegt.

Durch Angaben der Literatur (*Warburg* und Mitarbeiter, *O. Meyerhof*), sowie durch einige eigene Beobachtungen wurde die Frage nahegelegt, ob diese Autoxydation nicht bloß durch anwesende metallische Verunreinigungen bedingt sei und eigentlich nicht im Wesen des Glutathions liege.

Aus diesem Grunde wurde zuerst untersucht, ob die Autoxydation des Glutathions cyanempfindlich sei. Es wurde also der obige Versuch wiederholt, mit dem Unterschied, daß der Phosphatlösung an beiden Seiten 0,2 ccm 1 proz. KCN zugesetzt wurden, die zugleich zur Neutralisation des Glutathions ausreichten. Das Resultat des Versuchs ist in der Kurve KCN I wiedergegeben. Wie ersichtlich, beginnt beim Einlassen des Glutathions eine starke Autoxydation, die aber bald so gut wie ganz aufhört. In einem zweiten Versuch wurde das Cyan schon beim Auffüllen der Respirometer direkt der Glutathionlösung zugesetzt (Kurve KCN II). Hier wird in der ersten Hälfte des Versuchs gar kein Sauerstoff verbraucht, in der zweiten Hälfte nur geringe Mengen. Die Autoxydation des Glutathions ist also cyanempfindlich,

eine Beobachtung, die bereits an und für sich die Folgerung gestattete, daß an der Autoxydation des Glutathions Metallspuren wesentlich beteiligt sind.

Nun wurde versucht, das Glutathionpräparat durch verschiedene Methoden von den metallischen Verunreinigungen zu befreien. Die Erfolglosigkeit dieser Versuche ließ endlich vermuten, daß die vermuteten Metallspuren zum größten Teile gar nicht im Glutathionpräparat anwesend waren, sondern mit dem zur Verdünnung dienenden Wasser bzw. Phosphatlösung zugefügt wurden. Es ist doch bekannt, daß das gewöhnliche destillierte Wasser regelmäßig Kupferspuren enthält, die durch ihre Giftigkeit dieses Wasser z. B. für viele physiologische Versuche ganz unbrauchbar machen.

Es wurde also neues destilliertes Wasser hergestellt, das aus Jenaglaskolben über Jenaglaskühler in Jenakolben destilliert wurde. Hiermit wurde nun die alte molare Phosphatlösung zum Versuch verdünnt (s. Kurve Aqu. II). Endlich wurde aus diesem Wasser aus festem Kaliphosphat eine ganz frische Lösung hergestellt. Der hiermit angestellte Versuch ist in Kurve Aqu. III dargestellt.

Diese Befunde ließen keinen Zweifel mehr zu, daß die Autoxydation des Glutathions im Wesen den Metallspuren zuzuschreiben war, die zum größten Teil aus dem Wasser stammten. Es lag nun noch an der Hand zu versuchen, ob durch künstliche Metallzumengungen die Autoxydation wirklich zum ursprünglichen Werte erhöht werden kann. Der Versuch Aqu. III wurde unter Zugabe von etwas Eisen (Mohrsalz) wiederholt. Die Autoxydation stieg deutlich, erreichte aber nicht die ursprünglichen Werte. Nun wurde derselbe Versuch Aqu. III unter Zugabe von einem Tropfen 0,4proz. kristallinischer CuSO-Lösung wiederholt. Das Resultat ist in der Kurve Cu dargestellt. Durch Metall konnte also die Autoxydation sehr weitgehend gesteigert werden.

Die aus dem biologischen Standpunkt wichtige Frage war nun die, ob das Glutathion im Organismus die zu seiner Autoxydation nötigen Metallspuren vorfindet? Um auf diese Frage eine Antwort zu erhalten, wurde die Leber einer frisch getöteten Cavia zerkleinert, mit der gleichen Menge des obigen, aus Glas destilliertem Wasser versetzt, aufgekocht, zentrifugiert. Es wurde nun die Autoxydation des Glutathions dieses Kochsaftes untersucht.

Alle mit derartigem Kochsaft angestellten Versuche ergaben übereinstimmend, daß das Glutathion in ihm ganz inautoxydabel ist, also gar keine Autoxydation zeigt. 15 Minuten langes Durchleiten von Luft bei 37° verändert nicht die mit Nitroprussidnatron gemessene SH-Reaktion. Im Respirometer verbraucht der neutralisierte Kochsaft 30 Minuten lang keine Spur von Sauerstoff und behält unverändert seine Nitroprussid-SH-Reaktion und sein Jodbindungsvermögen. In

einem Versuch wurde die Sauerstoffaufnahme von 5 ccm Kochsaft 90 Minuten lang im Respirometer verfolgt. Obwohl der Kochsaft viel reduziertes Glutathion enthielt, wurde im Laufe der 90 Minuten nicht die geringste Sauerstoffaufnahme beobachtet (das Kontrollrespirometer wurde mit Phosphatlösung versetzt).

Aus diesen Versuchen ist es also wahrscheinlich, daß das Glutathion auch im Organismus nicht die zu seiner Autoxydation nötigen Metallspuren vorfindet und dort also auch praktisch inautoxydabel ist.

Die Oxydation des Glutathions.

Nachdem die Überzeugung gewonnen wurde, daß das Glutathion nicht autoxydabel ist, und es wahrscheinlich wurde, daß es auch im Organismus keiner Autoxydation unterliegt, ergab sich die Frage, ob diese Substanz im Organismus nicht durch den aktivierten Sauerstoff der Gewebe oxydiert wird? Diese Annahme schien *a priori* sehr wahrscheinlich, da doch bereits früher gezeigt wurde, daß bereits die Labilität des Wasserstoffs des p-Phenylendiamins genügend groß ist, um vom aktiven Sauerstoff der Gewebe oxydiert zu werden[1]). Die Labilität des Wasserstoffs der SH-Gruppe ist noch bedeutend größer wie die des Diamins. Dies tritt z. B. dem Wasserstoff- oder Äthylperoxyd gegenüber in frappanter Weise zum Vorschein, wird doch das Glutathion durch diese Peroxyde sozusagen augenblicklich zum Disulfid oxydiert. Es wurde also untersucht, ob der gewaschene Muskel, der das Diamin energisch oxydiert, zur Oxydation des reduzierten Glutathions befähigt sei.

Trotz der Erwartungen aber konnte ich mich durch die eindeutigen Resultate meiner Versuche überzeugen, daß das Glutathion durch den aktivierten Sauerstoff des gewaschenen Muskels nicht oxydiert werden kann. Es wurden hierüber Versuche in verschiedenen Variationen angestellt. Alle ergaben dasselbe negative Resultat.

Es soll z. B. folgender Versuch angeführt werden: Die Muskulatur einer frisch getöteten Cavia wird mit einem scharfen Hackmesser auf einem Brette fein zerkleinert, dann den *Thunberg*schen Angaben entsprechend dreimal $\frac{1}{4}$ Stunde lang mit dem 20fachen Volumen Wasser im Schüttelapparate gewaschen. Zur Waschung wurde Wasser benutzt, das im Jenaglasgefäß über Jenakühler in Jenagefäße destilliert wurde. Mit demselben Wasser wurde auch die Phosphatlösung zubereitet.

In die Hauptgefäße beider Respirometer werden 2 g des Muskels gesetzt und hier in 2 ccm Phosphat suspendiert. In das eine Seitengefäß des einen Respirometers wird 1 ccm neutrale, reduzierte 0,025 mol. Glutathionlösung gesetzt. In das entsprechende Seitengefäß des anderen Respirometers wurde dieselbe Glutathionlösung in oxydierter Form eingeführt. Die Luft dieser Seitengefäßchen über der Glutathionlösung wird an beiden Seiten

---

1) Diese Zeitschr. **150**, 195, 1924.

durch Wasserstoffgas ausgespült. Dann werden die Respirometer wie gewöhnlich im Verband mit dem Schüttelapparat an das Differentialmanometer angeschlossen und im Wasserbade (37°) versenkt. Nach Erreichen der Temperaturkonstanz (10 Minuten) wurde an beiden Seiten das Glutathion in die Kölbchen zum Muskel eingelassen. Wird nun das Glutathion durch den aktiven Sauerstoff des Muskels oxydiert, so muß sich an der Seite des reduzierten Glutathions eine energische Sauerstoffaufnahme zeigen. (Das oxydierte Glutathion an der anderen Seite wird nur langsam zu einem sehr geringen Maße reduziert.) Hingegen zeigt das Manometer während der 15 Minuten der Beobachtungszeit bloß einen Verbrauch von 10 cmm Sauerstoff, dieselbe Menge Sauerstoff, den die Glutathionlösung im Kontrollversuch auch ohne Muskel in derselben Zeit durch Autoxydation verbraucht. Der weitere Kontrollversuch ergibt auch, daß das Muskelpräparat Bernsteinsäure und *para*-Phenylendiamin rasch oxydiert, also zu energischer Sauerstoffaktivierung befähigt ist.

4. Reaktivierungsversuche mit aromatischen Oxyden und Aminen.

Es wurde bereits bei der Einleitung vorliegender Mitteilung besprochen, daß die Annahme, daß das Koferment als Wasserstofftransporteur ein Bindeglied zwischen der Wasserstoffaktivierung und der Sauerstoffaktivierung des gewaschenen Muskels darstellt, wohl als die wahrscheinlichste betrachtet werden kann. Es wurde nun versucht, ein künstliches Koferment, einen künstlichen Reaktivator auf Grund dieser Anschauung zu finden.

Daß der gewaschene Muskel zu einer energischen Sauerstoffaktivierung befähigt ist, wurde in der ersten Mitteilung vorliegender Reihe eingehender besprochen[1]). Es wurde dort gezeigt, daß bei der Oxydation des p-Phenylendiamins keine Wasserstoffaktivierung beteiligt ist und diese Oxydation allein auf eine Sauerstoffaktivierung zurückgeführt werden kann, daß also die Oxydation des p-Phenylendiamins als Ausdruck der Sauerstoffaktivierung, als Mittel zu deren Nachweis und Untersuchung dienen kann.

Aus der vorhergehenden Arbeit war das erste Glied des Systems, die Dehydrase, genügend bekannt. Hingegen schien es nötig, zum Ausbau dieses Reaktivierungsversuchs zuerst die durch p-Phenylendiamin nachweisbare Sauerstoffaktivierung noch etwas eingehender kennenzulernen.

Die obige Untersuchung über das Glutathion erbrachte auch in bezug auf die Sauerstoffaktivierung bereits eine Überraschung. Wie bereits besprochen, wurde gefunden, daß die Sauerstoffaktivierung, die eine energische Oxydation des p-Phenylendiamins bedingen kann, nicht imstande ist, das reduzierte Glutathion zum Disulfid zu oxydieren. Es mußte daher die Frage gestellt werden, ob dieses Versagen der Oxydation der SH-Gruppe eine Regelmäßigkeit darstellt oder ob hier

---

[1]) Diese Zeitschr. **150**, 195, 1924.

vielleicht nur eine sterische Hinderung vorliegt, die sich auf Grund der Formel des Glutathions recht gut vorstellen ließe.

Es wurde also untersucht, wie sich die Sauerstoffaktivierung gegenüber der Thioglykolsäure verhält, bei der kaum eine sterische Behinderung vorzustellen wäre. Das Resultat war ebenso negativ wie bei dem Glutathion. Die Sauerstoffaktivierung, die eine energische Oxydation des Diamins bedingt, ist also nicht imstande, die SH-Gruppe zu oxydieren.

Demgegenüber konnte aber mit anderen, dem Diamin verwandten aromatischen Verbindungen ein positives Resultat erhalten werden. Zum Teil in Übereinstimmung mit älteren Angaben von *Vernon*, *Batelli* und *Stern* konnte gefunden werden, daß der gewaschene Muskel mit annähernd derselben Intensität, außer dem p-Phenylendiamin auch noch das o-Phenylendiamin, p-Amidophenol, Hydrochinon, mit minderer Intensität aber doch noch deutlich das Brenzcatechin oxydieren konnte. Eine Wasserstoffaktivierung konnte nur beim Hydrochinon beobachtet werden, die aber gegenüber der Intensität der Oxydation unverhältnismäßig schwach war. Das Adrenalin wurde mit derselben Intensität oxydiert wie das verwandte Brenzcatechin.

Experiment. Als Material diente der Diphragmamuskel, der, mit dem Messer zerkleinert, dreimal bei Zimmertemperatur je ¼ Stunde lang mit der 20fachen Menge destillierten Wassers gewaschen wurde. Der Muskel wurde in Phosphat suspendiert und mit 0,7proz. neutralisiertem Amin bzw. Phenol versetzt. Das Kompensationsrespirometer wurde allein mit Phosphat + Amin bzw. Phenol versetzt. Temperatur 37°. Der Sauerstoffverbrauch ist in Kubikmillimetern pro Gramm Muskel in der Minute in nachstehender Liste verzeichnet:

p-Phenylendiamin	3,3
o-Phenylendiamin	3,3
p-Amidophenol	4,6
Hydrochinon	3,6
Brenzcatechin[1])	2,0
Adrenalin[1])	1,8

Dieses Resultat scheint darum so überraschend, weil doch der Wasserstoff der SH-Gruppe bedeutend labiler ist und bei der verwendeten Reaktion (p_H 7,2) ein viel höheres Reduktionspotential auf-

[1]) Die geringere Oxydation von Brenzcatechin und Adrenalin kann nicht auf eine Schädigung des Ferments zurückgeführt werden, da das nachträglich zugefügte p-Phenylendiamin mit unverminderter Intensität oxydiert wird. Ganz unoxydiert blieben o-, m- und p-Kresol, der Versuch läßt aber keine Konklusionen zu, da durch diese Substanzen auch das Ferment vernichtet wird. Darum kann ich es leider nicht sagen, ob die untersuchte Polyphenoloxydase auch zur Oxydation einwertiger Phenole befähigt ist, was zu wissen natürlich sehr interessant wäre. Leider stand mir kein anderes unschädliches einwertiges Phenol (z. B. Tyrosin) zur Verfügung.

weist als der Wasserstoff der verwendeten aromatischen Verbindungen, der hier aboxydiert wird. Diese Beobachtung zwingt also zur Konklusion, daß wir es in der Sauerstoffaktivierung nicht mit einem System zu tun haben, in dem der Sauerstoff diffus zu einem gewissen Oxydationspotential aktiviert wird, sondern daß hier eine typische Polyphenoloxydase vorliegt, ein Oxydationsferment, das typisch auf Phenole und Phenolderivate eingestellt ist.

Diese Konklusion gibt nun zu verschiedenen Bedenken Veranlassung. Die Tatsache ist nun die, daß das Gewebe zur Oxydation der Phenole über ein außerordentlich aktives Ferment verfügt, das selbst so viel Sauerstoff verbrauchen kann, wie die ganze normale Respiration der Zelle — ohne daß überhaupt ein Phenol bekannt wäre, das im Stoffwechsel der Zellen eine bedeutende Rolle spielt, die am großen Wege im Schema des Zellstoffwechsels liege. Und außerdem kann dieses Ferment doch auch gar nicht zum oxydativen Abbau dieser aromatischen Verbindungen bestimmt sein, da es doch die ganze aromatische Verbindung sozusagen gar nicht angreift, bloß den so reversiblen, labilen Wasserstoff abspaltet und die Verbindung in seine Chinon- bzw. Diiminform überführt[1]), die durch das Reduktionspotential, d. h. den aktiven Wasserstoff der Gewebe wieder mit Leichtigkeit in das ursprüngliche Phenol oder Amin reduziert wird.

Noch merkwürdiger erscheinen diese Befunde im Lichte der Ergebnisse der Pflanzenphysiologie. *W. Palladin*[2]) hat gezeigt, daß die Oxydation in den Pflanzen vielfach nicht durch den direkten oxydativen Angriff der Brennstoffe vor sich geht, daß das Oxydationsferment nicht direkt auf den Brennstoff, sondern bloß auf ein Phenol eingestellt ist und keine andere Funktion besitzt als die Oxydation des Phenols zum Chinon oder des Amins zum Imin (*Berthelot*). Dieses Chinon wird dann durch den aktiven Wasserstoff der Zellen wieder zur Ausgangssubstanz reduziert. Auf Grund der Arbeiten *Wielands* und *Thunbergs* wissen wir auch, daß die Abgabe eines solchen aktivierten Wasserstoffs im Wesen die Oxydation der Brennstoffe ist, die die Quelle des aktiven Wasserstoffs darstellen. Das Oxydations-

[1]) NH_2 … NH_2 → NH … NH

[2]) *W. Palladin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **55**, 207, 1908.

schema ist also auf Grund der *Palladin*schen bzw. *Wieland*schen Arbeit dieses:

1. Brennstoff + Chinon → Oxydationsprodukt des Brennstoffs + Dehydrase + Hydrochinon
2. Hydrochinon + Sauerstoff → Chinon + Wasser. + Polyphenoloxydase
3. Dann wiederholt sich Reaktion 1 usw.

Diese Tatsachen eröffnen nun die Möglichkeit, auch in der animalen Physiologie nach einer tiefergehenden, fundamentalen Bedeutung der Polyphenoloxydase des tierischen Gewebes zu suchen. Diese Möglichkeit gibt dann auch den vorliegenden Reaktivierungsversuchen des Milchsäureoxydators, Phenolen und aromatischen Aminen, eine tiefere Bedeutung als die eines bloßen Modellversuchs.

Um diesen Reaktivierungsversuch besser aufbauen zu können, schien es unumgänglich, zuerst die Kinetik der Oxydation durch die Polyphenoloxydase besser kennenzulernen. In erster Linie war das Verhältnis der Intensität der Oxydation zur Konzentration des betreffenden Phenols von Interesse. Es wurde also der Sauerstoffverbrauch bei variierter Phenolkonzentration gemessen. Bei allen Versuchen wurden alle Faktoren gleichgehalten, und nur die Konzentration des Phenols variiert.

Experiment. Der gewaschene, mit Glas zerriebene Muskel (2 g) wird in Phosphat (3 ccm) suspendiert in das Kölbchen des einen Respirometers eingeführt. Das Kölbchen des anderen Kompensationsrespirometers wird mit derselben Phosphatmenge ohne Muskel beschickt. In das eine Seitengefäß beider Respirometer wird 1 ccm des verschieden konzentrierten Phenols gesetzt. CO_2 wird nicht gebunden.

Nachdem das Respirometer 7 Minuten im Wasserbade geschüttelt wurde, wird die Phenollösung in das Kölbchen eingelassen. 3 Minuten später beginnt die Ablesung der Druckdifferenzen am Barcroftmanometer. Bei dieser Aufstellung fällt also die durch Autoxydation aufgenommene Sauerstoffmenge nicht in Rechnung. Auch wird die Oxydation nicht durch Anhäufung des Oxydationsprodukts gehemmt. Der gewaschene Muskel selbst (ohne Phenol) verbraucht keinen Sauerstoff, so daß die gemessene Druckdifferenz der reinen Oxydation des Phenols durch die Polyphenoloxydase entspricht.

Es wurde in dieser Weise zuerst die Kurve des p-Amidophenols aufgenommen. Diese ist in der Abb. 2 dargestellt und mit „p-Amidophenol" bezeichnet. Es konnte wohl vielleicht *a priori* erwartet werden, daß der Versuch eine gerade Linie ergeben wird. Gegen diese Erwartung ergab sie aber eine Krumme, die sich scheinbar asymptotisch an die Abszisse nähert und im ganzen eine Form zeigt, die wir als die typische Form jener Prozesse kennen, die wir unter dem Namen „Adsorption" zusammenfassen.

Wie ich denke, läßt diese Krumme nur eine an der Hand liegende Erklärung zu: daß der Oxydation eine Adsorption vorausgeht und die eigentliche Konzentration an der Plasmaoberfläche von der Intensität dieser Adsorption abhängt und nicht ohne weiteres der Konzentration der Außenflüssigkeit gleich ist, daß also die Konzentration an der Plasmaoberfläche und somit *die Oxydationsgeschwindigkeit der Substanz durch ihre Adsorbilität bestimmt wird.*

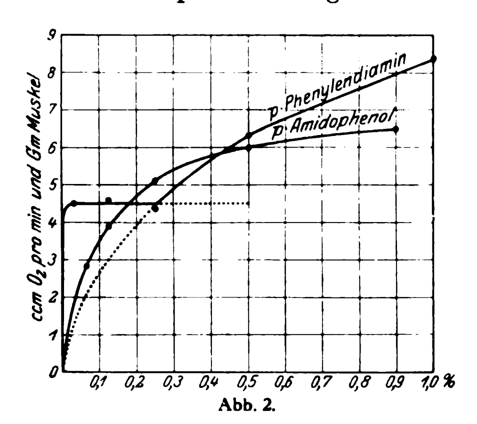


Abb. 2.

Dies ist, wie ich denke, ein sehr wichtiger Punkt, da wir doch aus der Biologie, hauptsächlich aus der Pharmakologie, wissen, daß die Zelle gewisse Stoffe weitgehend zu konzentrieren vermag, mit anderen Worten, daß verschiedene Substanzen die Eigenschaft besitzen können, durch die Zelle weitgehend konzentriert zu werden. Hiermit ist dann auch die Möglichkeit gegeben, daß schon sehr geringe Konzentrationen eines Phenols in energischer Weise oxydiert werden und energisch Sauerstoff verbrauchen können, wenn nur das Plasma imstande ist, die betreffende Substanz an seiner Oberfläche zu konzentrieren, i. e., wenn diese durch ihre besondere chemische Struktur eine solche Bindung ermöglicht.

Die Kurve der Oxydation des p-Amidophenols zeigt aber auch zugleich, daß von dieser Substanz aus dem Standpunkt unseres Reaktivierungsversuchs nicht viel zu erwarten war. Die Kurve zeigt einen viel zu flachen Verlauf. Es müssen also große Konzentrationen der Substanz verwendet werden, um eine intensive Oxydation zu erhalten. Nehmen wir aber eine solche große Konzentration, so wird durch die Wirksamkeit der Dehydrase, die das oxydierte Amidophenol wieder zu Amidophenol reduziert, die Amidophenolkonzentration und hiermit die Oxydationsintensität nur sehr wenig erhöht. Würden wir das ganze Amidophenol in seiner oxydierten Form verwenden, so müßte die Konzentration des reduzierten Amidophenols durch die Wirkung der Dehydrase erst hohe Konzentrationen erreichen müssen, ehe wir auf eine energischere Sauerstoffaufnahme rechnen können.

Einen ganz eigenartigen, alle Erwartungen übertreffenden Verlauf zeigt die Kurve des p-Phenylendiamins (s. Abb. 2). Die Kurve wurde in zwei ganz unabhängigen Versuchen aufgenommen und zeigte in beiden Versuchen einen identischen Verlauf. Hier zeigt die rechte

Seite der Kurve ebenfalls einen an Adsorption erinnernden Verlauf. An einem Punkte kommt aber ein Knick in die Kurve, und die Linie wird mit der Abszisse parallel, um in der unmittelbaren Nähe der Ordinate sozusagen vertikal zum Nullpunkt abzufallen. Mit anderen Worten ist die Intensität der Oxydation — wenn wir von der Seite der hohen Konzentrationen absehen — unabhängig von der Konzentration des Diamins und ist, solange noch überhaupt etwas Diamin da ist, maximal.

Die Deutung dieser Kurve scheint mir an der Hand zu liegen. Die Kurve wird eindeutig erklärt, wenn wir annehmen, daß das Plasma imstande ist, eine gewisse Menge des Diamins an seiner Oberfläche chemisch zu binden, mit anderen Worten eine beschränkte Anzahl von Valenzen hat, die mit dem Diamin quantitativ reagieren. Solange also überhaupt noch genügend Diaminmoleküle vorhanden sind, um mit diesen Valenzen zu reagieren, sind diese alle besetzt, und die Konzentration (und hiermit die Oxydationsgeschwindigkeit) des Diamins ist an der Plasmaoberfläche konstant. Neben dieser chemischen Bindung kann dann das Diamin, ähnlich wie das Amidophenol, durch eine diffusere Adsorption gebunden werden, die aber wegen der Flachheit der Krummen erst bei höheren Konzentrationen in Erscheinung tritt (rechte Seite der Kurve). Der basische Charakter des Amins — im Gegensatz zum sauren Charakter des Plasmas — könnte wohl die Grundlage dieser chemischen Bindung geben.

Wie aber auch die Interpretation der Kurve sei, fest steht, daß der gewaschene Muskel schon außerordentlich geringe Konzentrationen gewisser Substanzen, in unserem vorliegenden Falle des Diamins, mit einer sehr hohen Intensität unter sehr energischer Sauerstoffaufnahme zu oxydieren vermag[1]).

Dies ist, wie ich denke, ein außerordentlich wichtiger Punkt, der zugleich auch die Möglichkeit der gesuchten Reaktivierung eröffnet, und zwar mit außerordentlich geringen Mengen der als Koferment fungierenden Substanz. Denn ist diese in nur minimalen Konzen-

[1]) Es sei erwähnt, daß gelöste Eiweißstoffe die Oxydation des Diamins, wahrscheinlich durch die Bindung dieser Substanz, stark hemmen können, besonders wenn man mit so niedrigen Konzentrationen dieser Substanz arbeitet. Der Muskel muß also für diesen Versuch durch gründliche Extraktion von derartigen Stoffen gut befreit sein. Hierin zeigt das Diamin mit dem natürlichen Koferment auch eine enge Analogie. Die Versuche mit Diamin werfen auch einiges Licht auf die große Adsorbität des Koferments, die seine Darstellung so schwierig gestaltet. Diese große Adsorbität scheint eben im Wesen der Sache zu liegen, da nach den Erfahrungen mit Diamin eben nur diejenigen Substanzen als Koferment fungieren können, die sich durch eine große Adsorbität den Plasmaelementen gegenüber auszeichnen.

trationen vorhanden, so bedingt sie bereits eine sehr intensive Sauerstoffaufnahme. Ist das Koferment oxydiert und tritt nun die Wasserstoffaktivierung mit ihrer reduzierenden Wirkung in Kraft und reduziert eine nur sehr geringe Menge des Koferments, so wird die hohe Oxydationsintensität wieder erreicht, und durch das kontinuierliche stete Wiederholen des Prozesses wird sowohl die Wasserstoffaktivierung wie der Sauerstoffverbrauch in Gang gehalten, und die ganze Respiration, die Oxydation der Milchsäure, die ohne Diamin stillstände, kann glatt ablaufen.

Von dem Standpunkt der Frage, die die Anleitung zur ganzen Untersuchung über die Oxydationen gegeben hat, der Funktion der Nebenniere, ist dieser Punkt darum von so großer Bedeutung, weil sie die Möglichkeit eröffnet, daß gewisse Oxydationsprozesse schon durch so geringe Konzentrationen gewisser Substanzen vermittelt werden können, welche Konzentrationen bzw. absoluten Mengen auch durch innere Sekrete nicht unerreichbar sind.

Zuletzt wurde als letzte Vorbereitung des Reaktivierungsversuchs die Reduktion des oxydierten Diamins bzw. des Diimins untersucht. Hierbei wurde gefunden, daß der gewaschene Muskel das Diimin, ebenso wie das Methylenblau, nur außerordentlich langsam zu reduzieren vermag, da ihm doch keine Quelle für einen aktiven Wasserstoff (kein Brennstoff) zur Verfügung steht. Wird dem Muskel aber gleichzeitig mit dem Diimin Milchsäure oder Bernsteinsäure geboten, so wird das Diimin, analog dem Methylenblau, energisch reduziert, indem es den durch die Dehydrase aktivierten Wasserstoff dieser Substanzen übernimmt, wobei also das Diimin in Diamin, die Milchsäure und die Bernsteinsäure in ihr Oxydationsprodukt übergehen. Es ist natürlich, daß der Muskel, mit dem dieser Versuch angestellt wird, eine ungeschädigte Dehydrase enthalten muß, und daß der Versuch unter anaeroben Bedingungen ausgeführt werden muß, da sonst das Diamin wieder zu Diimin oxydiert wird.

Experiment. Der Versuch wurde derart angestellt, daß das Muskelpräparat in Phosphatlösung in Gegenwart von Sauerstoff einige Minuten bebrütet wurde. Hierbei wird ein Teil des farblosen Diamins zum tiefblauen Diimin oxydiert, das zum größten Teil fest an die Muskelelemente gebunden ist. Nun wird das Präparat mit Milchsäure oder Bernsteinsäure oder in der Kontrolle mit Wasser versetzt und im Thunbergröhrchen evakuiert bebrütet. Die Entfärbung indiziert ebenso wie beim Methylenblau die Reduktion des Diimins. Wird das entfärbte Präparat wieder in Gegenwart von Sauerstoff bebrütet, so nimmt es wieder die tiefblaue Farbe an, als Zeichen dessen, daß die Entfärbung tatsächlich nur auf eine Reduktion des Diimins zurückzuführen sei. Mißt man im Kontrollversuch die Sauerstoffaufnahme bei Aminzusatz in der Zeiteinheit, so kann man leicht berechnen, wieviel Imin bei der Bebrütung vor dem anaeroben Reduktionsversuch gebildet wurde, als wieviel Imin bei der Entfärbung reduziert werden mußte.

Somit waren also alle nötigen Komponenten des Reaktivierungsversuchs bekannt. Der Reaktivierungsversuch mußte also prinzipiell so angestellt werden, daß dem Muskel so viel Diamin zugesetzt wird, wie er rasch quantitativ wegoxydieren kann, so daß das Diamin, zu Diimin oxydiert, keinen Sauerstoff mehr verbraucht. In Gegenwart von Milchsäure mußte aber der Sauerstoffverbrauch weitergehen, bis auch die Milchsäure wegoxydiert ist, die an und für sich ohne Diamin keiner Oxydation unterliegt.

Experiment. Die Kölbchen der beiden Respirometer werden mit je 2 ccm Phosphat versetzt und in diesem je 1 g des Muskelpräparats suspendiert (Vorbehandlung des Muskels S. 54, II. Mitteilung). Zur Suspension an der einen Seite wird 0,1 ccm mol. Natriumlactat, an der anderen Seite ebensoviel Wasser zugesetzt. Außerdem wird zu beiden Suspensionen 0,5 ccm 0,1 proz. neutrale p-Phenylendiaminlösung gesetzt. CO_2 wird in gewöhnlicher Weise gebunden. Mit dieser Füllung wird nun der Versuch in üblicher Weise vorgenommen. Nach 10 minutigem Verweilen im Wasserbade ist die Temperaturkonstanz erreicht. In dieser Zeit vermag auch der Muskel das zugesetzte Diamin quantitativ zu oxydieren. Nun wird mit den Ablesungen des Differentialmanometers begonnen und der Druck um die Minute notiert. Die Beobachtung wird 15 Minuten lang fortgesetzt. Der Ausschlag des Manometers zeigt bei dieser Aufstellung das Plus an Sauerstoffverbrauch, der durch die Oxydation der Milchsäure bedingt wurde.

Die wiederholten Versuche geben an der Milchsäureseite ein kontinuierliches Plus an Sauerstoffverbrauch, der in einem Versuch 4,7 cmm O_2, im anderen Versuch 4,4 cmm O_2 in der Minute pro Gramm reinen Muskelgewebes beträgt. (Beobachtungsdauer im ersten Versuch 25 Minuten, im zweiten Versuch 20 Minuten.) Es ist also eine deutliche Reaktivierung des gewaschenen Muskels eingetreten.

Es ist mir ein besonderes Vergnügen, vorliegende Arbeiten mit einem innigen Dank an Herrn Dr. *J. de Hahn*, zeitweiligem Leiter des Groninger physiologischen Laboratoriums, abzuschließen. Sein besonderes Wohlwollen, sein reges Interesse, seine Freundlichkeit und Opferbereitschaft waren es, die mir die Arbeit ermöglichten, über die in den drei ersten Gliedern dieser Serie berichtet wurde.

Elektro-Ultrafiltration von Gelatine und Leim.

Von

H. Bechhold und **A. Rosenberg.**

(Aus dem Institut für Kolloidforschung, Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 24. Januar 1925.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

Zur Trennung der Kolloide von Kristalloiden bedient man sich seit *Graham* der *Dialyse*; zu dieser Reinigungsmethode ist dann durch *Bechhold* die *Ultrafiltration* hinzugekommen. In den letzten Jahren wurde ferner eine neue Methode in Anwendung gebracht: die *Elektrodialyse.*

Der Nachteil der *Dialyse* besteht darin, daß der Prozeß *sehr langsam* vor sich geht und *Verdünnung* des Produkts durch das Spülwasser erfolgt. Den letzteren Mangel teilt mit ihr die Elektrodialyse [*Wo. Pauli*[1]), *H. Freundlich*[2]) und *L. Farmer Loeb*] oder Elektroosmose [*Prausnitz*[3]), *Ruppel*[4]) und Mitarbeiter].

Durch die neuen *Ultrafiltergeräte*[5]) nach *Bechhold-König* war nun die Möglichkeit geboten, einen neuen Weg der Kolloidreinigung einzuschlagen, welcher oben erwähnte Mängel vermeidet. Wir nennen diese Methode *Elektro-Ultrafiltration* und schildern nachstehend unsere Versuche mit ihr an Gelatine und Leim.

Der *Grundgedanke* der Elektro-Ultrafiltration ist folgender: Die kolloide, zu reinigende Lösung kommt auf ein *Ultrafilter*, durch welches mit dem Wasser die darin gelösten Kristalloide abgesaugt werden; gleichzeitig wird durch elektrischen Gleichstrom eine Überführung

---

[1]) *Wo. Pauli*, Kolloid-Zeitschr. **31**, 252, 1922; Klin. Wochenschr. **3**, 1, 1924.

[2]) *H. Freundlich* und *L. Farmer Loeb*, diese Zeitschr. **150**, 522—534, 1924.

[3]) *Prausnitz*, Zeitschr. f. Elektrochemie **28**, 1—2, 1922; Kolloid-Zeitschr. **29**, 6, 1921.

[4]) *O. Ruppel*, Ber. d. D. pharmazeut. Ges. **30**, 314, 1920; Zeitschr. f. Hyg. **97**.

[5]) *Bechhold* und *Gutlohn*, Zeitschr. f. angew. Chem. 1924, S. 494 u. ff.

der Ionen, eine Beschleunigung der Trennung des Wassers von den Kolloiden und der Wasserbewegung nach einer oder beiden Elektroden erzielt. So sollte es möglich sein, mit einer *raschen Beseitigung von Elektrolyten* durch die elektrische Überführung *und von* sonstigen *Kristalloiden gleichzeitig* eine *Konzentration des Sols* zu erzielen. Hier sei vorausgeschickt, daß unsere Erwartungen in vollem Maße erfüllt wurden.

Die Apparatur.

Die Ultrafiltration wird vorgenommen in den Ultrafiltergeräten nach *Bechhold-König*[1]). Dies sind Gefäße aus poröser Porzellanerde, welche in verschiedenen Formen angefertigt sind. Es gibt Tiegel, Schalen, Nutschen, Ballonfilter (in der Art der Pukallfilter) und Kerzen. Die Tiegel usw. werden wie ein Goochtiegel oder eine Nutsche auf eine Saugflasche gesetzt und die Filtration erfolgt unter Luftüberdruck. Das Innere dieser Geräte sowie der Teil, welcher sich im Vakuum befindet, ist unglasiert, das übrige glasiert. Die Ballonfilter werden in die zu ultrafiltrierende Lösung getaucht, und es wird von außen nach innen filtriert; sie sind besonders vorteilhaft, wenn in der Wärme filtriert werden soll.

Um aus diesen Geräten *Ultrafilter* herzustellen, ist es nur nötig, sie mit einer Ultrafiltermembran zu überziehen. Wir wollen dies an einem Tiegel erläutern: Der Tiegel wird wie ein Goochtiegel auf eine Glastulpe mit Gummidichtung aufgesetzt und mit einer Lösung von Kollodiumwolle in Eisessig gefüllt [Eisessigkollodium[2])]. Dann wird ½ Minute angesaugt, der Tiegel von der Saugflasche abgenommen, die Lösung unter ständigem Drehen des Tiegels ausgegossen, bis nur wenige Tropfen sich mehr loslösen, und schließlich wird der ganze Tiegel mit einem Ruck in Wasser getaucht um die Schicht zu kogulieren. Nun läßt man einige Zeit in Wasser liegen, um die Essigsäure zu entfernen, oder man wäscht diese auf der Saugflasche aus, zum Schluß unter Zusatz von einigen Tropfen Ammoniak. Verwendung von warmem Wasser beschleunigt die Entsäuerung. Diese Membranen haben sich besser bewährt als die Alkohol-Äther-Kollodiummembranen.

Die anders geformten Geräte werden in analoger Weise mit Ultrafiltermembranen versehen.

Solche Filter, welche z. B. eine 7proz. Membran tragen, halten Eiweiß und Hämoglobin vollkommen zurück; eine 10proz. Membran hält Gelatine zurück. Solche Proteïnlösungen lassen sich in diesen Geräten an der Wasserluftpumpe von ihren Lösungsmitteln trennen und konzentrieren.

Für die *Elektro-Ultrafiltration* sind nun die Geräte noch mit Elektroden versehen. Zu diesem Zwecke werden sie auf der Filtratseite mit einem porösen, leitenden Metall-, z. B. Silber-, Nickel- oder Platinüberzug ver-

---

[1]) Die Ultrafiltergeräte nach *Bechhold-König* werden hergestellt von der Staatl. Porzellanmanufaktur Berlin, Wegelystr.

[2]) Die Chemische Fabrik auf Aktien (vorm. Schering) Berlin, Müllerstraße, liefert solche Lösungen mit einem Gehalt von 10 Proz. Kollodiumwolle und 2,5 Proz. Kaliumcarbonat in Eisessig, die sich besonders bewährt haben. Je nach der gewünschten Dicke der Membran müssen diese Lösungen mit Eisessig verdünnt werden.

sehen. Bei der Spülmethode kann man als Anode ein Platinblech oder einen Kohlestift als Elektrode verwenden.

Die Versilberung bzw. Platinierung wurde anfangs in der Weise vorgenommen, daß wir in einer kolloiden Silberlösung Stärke aufschwemmten, das Ganze durch Erhitzen verkleisterten und diesen Silber- bzw. Platinkleister auf die zu metallisierende Fläche auftrugen. Nach dem Trocknen und Glühen bekamen wir dann eine poröse oberflächliche Metallschicht. Da diese Schicht jedoch einen sehr hohen Widerstand aufweist, wurden später andere Methoden angewendet, auf die an anderer Stelle zurückgekommen werden soll.

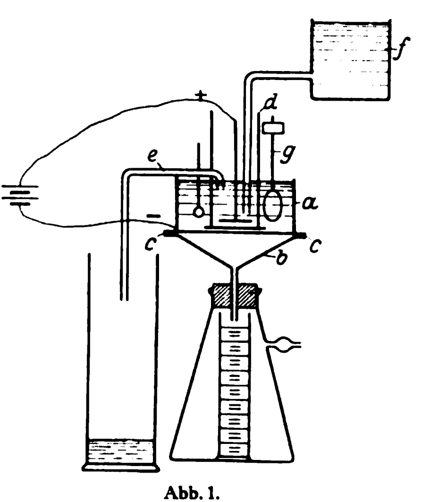


Abb. 1.

Füllt man in eine solche Schale Wasser, so tropft es nur sehr langsam durch. Legt man jedoch an den Metallüberzug die Kathode und taucht in das Wasser eine Anode (Spannung 110 bis 120 Volt), so beginnt das Wasser rasch zu tropfen oder zu fließen. Die Einfügung einer Ultrafiltermembran bedeutet nur einen erhöhten Widerstand; die Vorgänge an sich bleiben die gleichen. Setzt man eine solche metallisierte Schale auf eine Saugflasche über ein Vakuum und schaltet Gleichstrom ein, so addieren sich Luftdruck und Elektroosmose: es erfolgt ein rascher Durchfluß von Wasser.

Für die *Elektro-Ultrafiltration* von *Gelatine* und *Leim*, wie überhaupt von Proteinen, benutzen wir *zwei Versuchsanordnungen*, die nachstehend beschrieben seien:

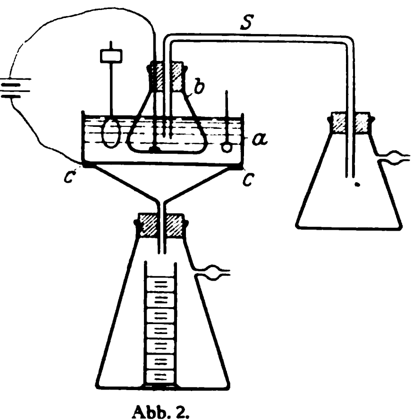


Abb. 2.

Die *erste*, die *Spülmethode*, zeigt (Abb. 1) eine außen unten versilberte und innen mit Ultrafiltermembran ausgekleidete zylindrische Schale *a*, die mit Gummiringdichtung auf dem Trichter *b* sitzt. Sie dient zur Aufnahme der zu reinigenden Lösung. Der Strom kann entweder mittels eines Metallblechs *c*, welches beim Ansaugen der Schale fest an deren Boden gedrückt wird, zugeführt werden, oder bei der Versilberung der Schale ist ein Silberstrich an der Außenwand in die Höhe geführt und ein Metallblech wird mittels eines Gummirings fest an den Strich gepreßt. Der zweite Elektrodenraum ist ein mit eiweißdichtem Pergament überspannter Glaszylinder *d* mit einem Ansatzrohr *e*. In den Zylinder war eine Platinelektrode von 10 qcm Fläche, in einem Abstand von 20 mm von der anderen Elektrode, gesenkt. Der Glaszylinder wird aus dem Behälter *f* kontinuierlich mit

Wasser bespült. Der mit Elektromotor betriebene Rührer *g* sorgt für die nötige Bewegung. Gesaugt wird mit einer guten Wasserstrahlpumpe. Für Messungszwecke senkt man ein graduiertes, zylindrisches Gefäß in die Saugflasche.

Bei der *zweiten* Anordnung (*Doppelfiltration*, Abb. 2) wird in die Schale ein Ballónfilter *b* gesenkt. Es ist außen mit der Ultrafiltermembran, innen mit einer Platinschicht versehen und erhält den Strom durch einen dicken, abgeplatteten Platindraht zugeführt.

Der Gleichstrom wurde einer Experimentierschalttafel entnommen und alle folgenden Versuche mit der konstanten Klemmenspannung von 115 Volt ausgeführt.

Vorversuche.

Versuche zur Ermittlung des *Verhaltens der Ultrafilterträger* ergaben, daß die Filtrationsgeschwindigkeit von Wasser durch die Ultrafiltergeräte mit der Zeit abnimmt, um nach ein- bis zweistündiger Benutzung einen konstanten Wert anzunehmen. Die Filtrationsgeschwindigkeit nimmt weiter ab, wenn die Geräte vor neuer Benutzung an der Luft trocknen, während sie sich beim Aufbewahren in Wasser nicht mehr verändert. Wurden die Geräte im Vakuum mit Wasser getränkt, so erwies sich die Filtrationsgeschwindigkeit drei- bis viermal höher als bei an der Luft befeuchteten Geräten. Offenbar verstopfen Luftblasen die Kapillaren. Es soll also als Regel beachtet werden, daß neue Ultrafiltergeräte im Vakuum befeuchtet und benutzte in Wasser aufbewahrt werden.

Die *Bechhold-König*schen Ultrafiltergeräte sind gegen Wasser negativ geladen. — Was für die Abnahme der Filtrationsgeschwindigkeit gesagt ist, gilt auch für den elektroosmotischen Wassertransport.

Adsorption des Filtermaterials.

Es wurde geprüft, ob das Ultrafilter Gelatine und Leim adsorbiert und dadurch größere Dichtigkeit vortäuscht. Bei unseren Ultrafiltermembranen ist dies nicht der Fall[1]). Versuche mit dem Material der Porzellanerdegeräte zeigen (Tabelle I), daß dieses Gelatine und Leim, wenn überhaupt, so doch nur in Spuren adsorbiert. Dies wurde durch Schütteln von 10 g Lösung mit 0,5 g fein gepulvertem Tiegelmaterial und Bestimmung des Trockengehalts vor und nach dem Schütteln festgestellt.

Tabelle I.

	Trockengehalt		
	der Ausgangslösung Proz.	der Blindprobe Proz.	mit Tonerdepulver Proz.
Gelatine	5,50	5,31	5,28
Leim I	5,50	5,44	5,38
Leim II	5,50	5,35	5,29

[1]) *Bechhold*, Zeitschr. f. physikal. Chem. 60, 257, 1907.

Die Abnahme des Trockengehalts bei der Blindprobe ist auf Bildung von Proteinhäuten durch das Schütteln zurückzuführen.

Nach *Wegelin*[1]) zeigen Eisessigkollodiummembranen *Alterserscheinungen* in bezug auf Durchlässigkeit der aus ihnen hergestellten Ultrafilter. Sie äußern sich darin, daß die Durchlässigkeit der Filter mit dem Alter der Kollodium*lösungen* abnimmt. Wir konnten diese Beobachtung bestätigen und feststellen, daß die Alterung nach einer gewissen Zeit aufhört. Es wurde eine mehrere Jahre alte Kollodiumlösung von 10 Proz. Kollodiumgehalt, die stets Membranen gleicher Durchlässigkeit gab, mit Eisessig auf 7 Proz. Kollodiumgehalt verdünnt und in Intervallen von 10 Tagen Ultrafilter aus dieser Lösung hergestellt, die dann untersucht wurden.

Tabelle II.

U = Ultrafiltration, Eo (115) = Elektroosmose bei 115 Volt Klemmenspannung, EU (115) = Elektro-Ultrafiltration bei 115 Volt Klemmenspannung. Druck: 70 cm Hg. Temperatur 20°. Filtrat: Wasser. Ultrafilter: 7 proz.

	Durchlaufswerte für 10 Minuten		
	am Tage der Verdünnung ccm	nach 10 Tagen ccm	nach 20 Tagen ccm
U.	143,0	110,0	110,0
Eo. (115)	25,5	18,0	19,0
Eo. (70)	14,9	10,5	11,2
EU (115)	169,0	128,0	129,0
EU (70)	157,6	120,3	121,2

Aus Tabelle II erkennt man auch aus den Filtratmengen den Effekt der Ultrafiltration, der Elektroosmose und der Elektro-Ultrafiltration (Kombination von Elektroosmose mit Ultrafiltration). Man erkennt, daß die Wirkung der Kombination im großen ganzen eine additive ist.

Schließlich sei hervorgehoben, daß sich die Ultrafilter bis auf 0,4 Proz. bei der Ultrafiltration, und bis 5,0 Proz. bei der Elektroosmose reproduzieren lassen.

Elektro-Ultrafiltration von Gelatine und Leim.

Man betrachtet beste *Gelatine* als eine ziemlich einheitliche Substanz, die im wesentlichen aus Glutin besteht; stets enthält sie gewisse Mengen Salze.

Leim enthält neben Glutin auch Abbauprodukte in geringerem oder höherem Grade, je nach Güte. Daneben enthält er anorganische Salze, je nach Güte, ebenfalls in verschiedenem Grade.

[1]) *Wegelin*, Kolloid-Zeitschr. 18, 6, 1916.

Bei *Gelatine* besteht die Aussicht, durch Elektroultrafiltration die anorganischen Salze weitgehend zu entfernen, was durch bloße Dialyse nur schwer gelingt. Bei *Leim* war die Möglichkeit geboten, kristalloide Abbauprodukte sowie Salze weitgehend zu entfernen, so daß man einerseits Glutin erhielt, andererseits Fraktionen von Abbauprodukten und Salzen.

Zunächst galt es festzustellen, welche Art von *Ultrafiltermembran* erforderlich sei.

Eine 1 proz. Handelsgelatine wurde durch 4-, 7- und 10 proz. Eisessig-Kollodiummembranen *ultrafiltriert*. Filtrate durch die beiden ersteren gaben mit Tanninlösung einen dicken Niederschlag, während die durch die 10 proz. Membran filtrierte nur mehr eine unmerkliche Trübung wahrnehmen ließ.

Ein weiterer Versuch galt der Entscheidung darüber, wie sich die *Membran bei der Elektroosmose* verhält.

Durch die Untersuchungen von *Prausnitz*[1]) besitzen wir bereits recht eingehende Kenntnisse über das Verhalten von Leim und Gelatine bei der Elektroosmose. Als amphotere Substanz wandert Gelatine bei saurer Reaktion zur Kathode, bei alkalischer zur Anode.

Wir stellten nun fest, daß allein die kataphoretische Bewegung der Gelatine genügt, um ein Ultrafilter, das bei Unterdruck undicht ist, zu passieren.

1 proz. Gelatinelösung wurde gegen Lackmus genau neutralisiert und in die Ultrafilterschale *a* (Abb. 1) gefüllt. Der Glaszylinder mit dem Anodenraum war mit einer auf Filterpapier hergestellten Äther-Kollodiummembran überspannt. Als kathodische Membran hatte die Schale einen 4 proz. Eisessigkollodiumüberzug.

10 Minuten nach Stromschluß schlug die Farbe der Lackmustinktur, mit der die Gelatinelösung versetzt war, in Rot um.

Tabelle III.

Dauer in Min.	Überführtes Wasser ccm	Tanninreaktion	Dauer in Min.	Überführtes Wasser ccm	Tanninreaktion
10	4,0	—	10	0,5	stark +
10	2,5	schwach +	10	0	
10	1,0	stark +			

Daraus ergab sich, daß bei saurer Reaktion in der Tat die Gelatine mit dem Wasser die kathodische Membran passierte. Mit der sauren Reaktion geht aber auch eine Abnahme der Wasserüberführung durch die kathodische Membran einher. Wird statt Kollodium eiweißdichtes

---

[1]) *Prausnitz*, l. cit.

Pergament als Anodendiaphragma verwendet, so bleibt die Gelatine neutral und das nach der Kathode überführte Wasser ist fast frei von Gelatine. Bei der Elektroultrafiltration ist also darauf zu achten, daß kathodisch eine negative, anodisch eine positive Membran zur Anwendung kommt, um äquivalente Mengen von Kationen und Anionen zu entfernen.

Die Entfernung der Elektrolyte.

Zur Verwendung kamen zwei Gelatinesorten, die stets in 1 proz. Lösung und drei Leimsorten, die in 5,5 proz. Lösung dem Prozeß unterworfen wurden. Leim I war ein geringwertiger Knochenleim, Leim II ein mittlerer, Leim III ein besserer Lederleim.

Gegen Lackmus waren die Gelatinelösungen neutral, die Leimlösungen schwach sauer. Gegen Methylorange waren sämtliche Lösungen alkalisch, gegen Phenophthalein sauer. Die Lösungen wurden gegen Lackmus genau neutralisiert.

Als Maß der Entsalzung wählten wir die Herabsetzung des *Aschengehalts*. Da zu erwarten war, daß nicht alle Aschenbestandteile sich bei der Reinigung gleich verhalten, haben wir die gesonderte Bestimmung der wichtigsten Aschenbestandteile vorgenommen, auf die Weise, daß die Probe durch schwaches Glühen verkohlt und mit n/10 Salzsäure extrahiert wurde. Der Rückstand ergab in Form seiner Asche das „Unlösliche", in der Lösung wurden die „Sesquioxyde" (Eisen und Aluminium), Kalk und Sulfate bestimmt (Tabelle IV). Der in Salzsäure unlösliche Teil besteht aus Eisen und Kieselsäure und stellt offenbar die mechanischen Verunreinigungen dar, die während des Fabrikationsprozesses in das Produkt gelangen.

Tabelle IV.

Anfangstemperatur 22°. Gehalt in Prozenten.

		Asche	Unlösliches	Sesquioxyde	CaO	SO_3
1 proz. Gelatine	I	0,69	0,16	—	0,23	0,25
	II	1,89	0,24	0,43	0,32	0,26
5,5 proz. Leim	I	1,57	0,24	0,37	0,22	0,23
	II	1,56	0,38	0,34	0,21	0,29
	III	1,74	0,23	0,41	0,40	0,28

Die Spülmethode (s. Abb. 1).

Bei allen Lösungen wurden 100,0 ccm dem Prozeß unterworfen. Als Kathode diente der Platinüberzug der Schale; der Glaszylinder als Anodenraum war von dem zu reinigenden Sol durch eine positiv geladene, eiweißdichte Pergamentmembran getrennt. Das Reinigungswasser floß mit einer Stundengeschwindigkeit von 800 ccm. Die Klemmenspannung war 115 Volt, der Unterdruck etwa 70 mm Hg.

Tabelle V.

		Dauer Min.	Filtrat ccm	Trockengehalt Proz.	Asche Proz.	Unlösliches Proz.
1 proz. Gelatine	I	32	24,0	1,0	0,19	0,15
	II	40	21,0	0,9	0,29	0,29
5,5 proz. Leim	I	40	25,0	4,8	0,25	0,21
	II	40	24,0	4,7	0,10	0,10
	III	40	22,0	4,7	0,22	0,19

Der Reinigungseffekt bezüglich der Elektrolyte ergibt sich aus Tabelle V, wenn wir diese mit Tabelle IV vergleichen. Danach wird eine praktisch *vollständige Entfernung der Elektrolyte* erzielt, da die Asche des gereinigten Produkts nur aus „Unlöslichem" besteht, also aus mechanischen Verunreinigungen, die nicht in Ionenform vorhanden waren. Analysen in Zwischenstadien der Reinigung ergaben, daß die zweiwertigen Ionen *rascher* als die dreiwertigen aus den Solen entfernt werden. Eine Konzentrierung der Sole wurde nicht erreicht; offenbar wurden sie aus dem Anodenraum durch das Spülwasser etwa in dem Maße verdünnt, als Wasser elektroultrafiltrierte.

Die gereinigten Gelatinelösungen reagieren auf Lackmus neutral und sind wasserklar, *trüben sich*, im Gegensatz zu den Ausgangslösungen, auch beim längeren Stehen *nicht*.

Weder in den Ultrafiltraten, noch im anodischen Spülwasser konnte *Gelatine* nachgewiesen werden. Dagegen enthalten die Ultrafiltrate der *Leimsole Abbauprodukte* des Glutins, während das anodische Spülwasser auch bei den Leimen keine organischen Substanzen enthielt. Die Ultrafiltrate enthielten bei

Leim I . . . . 7,2 Proz. Trockensubstanz
„ II . . . . 5,7 „ „
„ III . . . . 4,8 „ „

bezogen auf 100 g gereinigten Trockenleim[1]).

Während des Reinigunsgprozesses trübt sich der Leim und es bilden sich dicke *Flocken*. Ähnliches ist von *Prausnitz* bereits bei der Elektrodialyse des Leimes beobachtet worden[2]). *Prausnitz* teilt über diese Flocken mit, daß sie getrocknet harte, brüchige Massen von dunkelolivgrüner Farbe darstellen und sich in Säuren, Laugen und manchen Salzen lösen.

[1]) Der in Tabelle V angegebene Trockengehalt bezieht sich auf Sole, die von dem *flockigen Niederschlag* befreit worden sind, der sich während des Reinigungsprozesses bildet.

[2]) *Prausnitz*, Zeitschr. f. Elektrochem. **28**, 1—2, 1922; Kolloid-Zeitschr. **29**, 6, 1921.

Wir haben die abzentrifugierten und mit Wasser gewaschenen *Flocken* etwas näher untersucht. In Wasser sind sie unlöslich, in n/10 Salzsäure, n/10 Kalilauge und in verdünnter Kochsalzlösung sehr leicht löslich. Kalilauge löst die Substanz auch in 0,01 Normalität sehr leicht, n/100 Salzsäure dagegen sehr schwer. Aus ihren Lösungen wird die Substanz durch Halbsättigung mit Ammonsulfat gefällt. Durch das Trocknen nimmt die Löslichkeit stark ab, nur in Alkalien bleibt sie eine gute. Aus diesen Löslichkeitsverhältnissen folgt, daß die geflockte Substanz ein Protein von *globulinartigem* Charakter ist, das aus den vielleicht bluthaltigen Rohmaterialien stammen dürfte.

Es enthielten

Leim	I	6,9 Proz. Globulin
„	II	4,9 „ „
„	III	2,3 „ „

bezogen auf gereinigten Trockenleim. Da Leim I der geringstwertige, Leim III der beste war, so ergibt sich, daß geringwertige Leime einen höheren Globulingehalt aufweisen als hochwertige (Gelatine ist frei von Globulin).

Der Aschengehalt der getrockneten Globuline beträgt bei

Leim	I	0,63 Proz.
„	II	1,92 „
„	III	2,60 „

Die Asche ist in verdünnter Salzsäure unlöslich und besteht fast ausschließlich aus Eisenoxyd. Offenbar wird es beim Ausflocken der *Globuline* von diesen *adsorbiert* und niedergerissen.

Die *gereinigten Leimsole* sind durchsichtiger und heller als die ungereinigten, der *Leimgeruch* ist *verschwunden* und das erhaltene Produkt hat mehr ein *gelatineartiges Aussehen.*

Die Doppelfiltration (s. Abb. 2).

Schale *a* und Ballonfilter *b* sind mit Eisessigkollodiummembran versehen. Der Platinüberzug der Schale *a* dient als Kathode. Der Innenbelag (Platin) des Ballonfilters *b* als Anode. Es wird gleichzeitig an *a* und *b* gesaugt, also *nach beiden Seiten* ultrafiltriert. Es erfolgt somit im Gegensatz zur „Spülmethode“ eine *Konzentration* des Filterinhalts. Das Saugrohr *S* reicht nicht bis zum Boden des Ballonfilters, um ein mangelhaftes Bespülen der Anode beim sofortigen Absaugen des Ultrafiltrats zu vermeiden. Zeitweise kann das Saugrohr auf kurze Zeit bis zum Boden gedrückt werden, um die angesammelte Flüssigkeit in die Saugflasche zu befördern.

Tabelle VI.

Menge 100 ccm		Dauer Min.	Filtrat (Kathode + Anode) ccm	Trockengehalt Proz.	Asche Proz.	Unlösliches Proz.
1 proz. Gelatine	I	20	34,0	1,45	0,22	0,22
	II	60	38,5	1,53	0,28	0,26
5,5 proz. Leim	I	60	45,5	8,15	0,24	0,23
	II	60	41,5	8,18	0,12	0,12
	III	60	39,0	8,03	0,26	0,25

Die *Entsalzung* ist auch hier *vollständig* (vgl. Tabelle VI mit Tabelle IV), die Asche des gereinigten Produkts besteht nur aus „Unlöslichem".

Die längere Reinigungsdauer bei dieser Methode ist darauf zurückzuführen, daß die Elektrolyte nicht mit Wasser, wie bei der Spülmethode, von den Elektroden entfernt werden, sondern mit nachgesaugtem elektrolythaltigen Dispersionsmittel, welches längere Zeit im Stromkreis bleibt. Dies gibt sich auch durch langsamere Abnahme der Stromintensität, also größeren Stromverbrauch im Vergleich mit der Spülmethode zu erkennen, wie Abb. 3 zeigt, in welcher der Verlauf

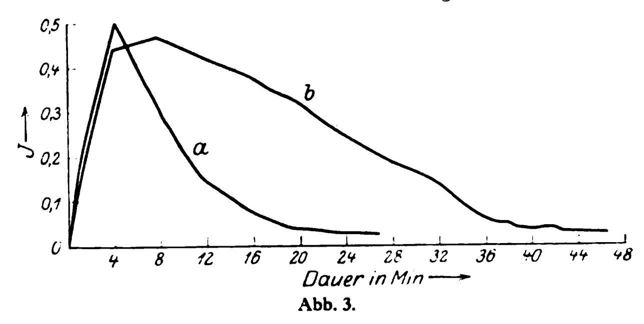


Abb. 3.

der Stromintensität bei der Reinigung von Leim II einmal mit der *Spülmethode a*, das andere Mal durch *Doppelfiltration b* angegeben ist.

Die ausgeflockten *Globuline* waren teils als Flocken im Sol, teils als festhaftende Schicht an der anodischen Membran; sie werden hier in annähernd gleicher Menge abgeschieden wie bei der Spülmethode bei

Leim I . . . . 6,9 Proz. Globuline
„ II . . . . 4,7 „ „
„ III . . . . 2,2 „ „

Der Gehalt an Trockensubstanz im kathodischen und anodischen Ultrafiltrat war bei

Leim I . . . . 15,4 Proz.
„ II . . . . 10,5 „
„ III . . . . 8,3 „

auf 100 g gereinigten Trockenleims bezogen.

Das Aussehen der gereinigten Sole stimmt mit den mit der Spülmethode gereinigten überein. Gegen Lackmus sind die Sole neutral.

Betrachtet man die Substanzverminderung, welche die Entfernung der Elektrolyte, der Abbauprodukte des Glutins und die Ausflockung der Globuline ergibt, als Maß der Leistungsfähigkeit des Reinigungsverfahrens, so ermöglicht die *Doppelfiltration* für die Abbauprodukte einen *wesentlich günstigeren* Effekt, wie Tabelle VII zeigt.

Tabelle VII.

	Substanzverminderung					
	Leim I		Leim II		Leim III	
	Spülmethode Proz.	Doppelfiltration Proz.	Spülmethode Proz.	Doppelfiltration Proz.	Spülmethode Proz.	Doppelfiltration Proz.
Elektrolyte	1,3	1,3	1,4	1,4	1,5	1,5
Abbauprodukte . . .	7,2	15,4	5,7	10,5	4,8	8,3
Globuline	6,9	6,9	4,9	4,7	2,3	2,2
Gesamtverminderung	15,4	23,6	12,0	16,6	8,6	12,0

Bei beiden beschriebenen Reinigungsverfahren steigt die Temperatur an, jedoch nicht über 60°.

Alle Versuche sind in bezug auf Dauer und Reinigungseffekt vollständig reproduzierbar, wenn bei sonst gleichen Bedingungen auch das Ultrafilter die gleiche Durchlässigkeit hat.

Bei Gelatinesolen verstopft sich das Ultrafilter nur wenig, und die ursprüngliche Durchlässigkeit läßt sich durch Auswaschen mit Wasser annähernd wieder herstellen.

Das gleiche gilt auch für Leime, wenn sie ohne Strom ultrafiltriert werden, obwohl hier die Verstopfung rascher eintritt durch Eiweißabbauprodukte, die das Ultrafilter passieren. Noch rascher erfolgt die Verstopfung bei der Elektro-Ultrafiltration von Leimen. Die Durchlässigkeit der frischen Filter läßt sich durch Auswaschen mit Wasser nicht wieder herstellen. Merkwürdigerweise erweist sich der Träger selbst nach dem Abschaben der Membran als verstopft. Das anodische Ultrafilter war hingegen nie in so hohem Grade verstopft wie das kathodische. Diese Beobachtungen deuten darauf hin, daß die *Globuline* des Leimes das Ultrafilter passieren und in der Tonwand des Trägers unlöslich zurückbleiben. Anodischerseits ist dies nicht der Fall, weil die Globuline an der Membran bereits geflockt werden.

Tatsächlich gelang es, das kathodische Ultrafilter *durch Waschen mit verdünnter Kochsalzlösung zu regenerieren* bzw. die Globuline aus den Poren des Trägers herauszulösen. Allerdings ist dann mit höherem Stromverbrauch und Ansteigen der Temperatur zu rechnen.

Allgemeines.

Bei der Spülmethode wird anodisch die positiv geladene Pergamentmembran, kathodisch das negative Kollodiumfilter verwendet im Gegensatz zur Doppelfiltration, bei welcher beide Ultrafilter negativ geladen sind.

Entgegen der Erwartung, daß die Sole bei der Doppelfiltration sauer werden, da negative Diaphragmen den Durchtritt für Anionen hemmen, waren die Sole während der Reinigung neutral geblieben; eine Umladung des anodischen Ultrafilters, wie durch Überführungsversuche nachgewiesen wurde, war nicht eingetreten. Es muß also angenommen werden, daß seine Ladung auf ein ganz geringes Maß herabgesetzt wird.

Ist diese Erklärung richtig, so muß die Durchlaufsgeschwindigkeit durch das kathodische Ultrafilter größer, durch das anodische die gleiche sein wie bei Ultrafiltration ohne Strom.

Die Versuche, die wir mit 1,5proz. Kaliumsulfatlösung ausgeführt haben, bestätigen, daß sich in bezug auf die Entfernung äquivalenter Mengen von Kationen und Anionen eine günstige Membranladung durch Produkte der Elektrodenvorgänge einstellt (Tabelle VIII). Die Schale bzw. das Ballonfilter wurde zu dem Zwecke mit 10proz. Ultrafilter (s. Abb. 2) einmal als kathodisches (*a*), das andere Mal als anodisches (*b*) Diaphragma verwendet. Die gewählte Elektrolytkonzentration entsprach annähernd der der Leim- und Gelatinesole.

Tabelle VIII.
Klemmenspannung 115 Volt.

	Ohne Strom ccm	*a* ccm	*b* ccm
Schale	130,0	170,5	129,5
Ballonfilter	64,5	85,0	64,0

Aus dem *Vergleich* der *Doppelelektro-Ultrafiltration mit* der *Elektrodialyse* ergibt sich als wesentlicher Vorteil, daß bei der ersteren auf Verwendung von Spülwasser und Regulierung der Membranladung verzichtet werden kann. Die Doppelfiltration wird besonders dort mit Vorteil angewendet werden, wo eine Verdünnung des Sols unerwünscht ist oder die entfernten Elektrolyte und Eiweißabbauprodukte gewonnen werden sollen.

Die Doppelfiltration wurde außer bei Gelatine und Leim auch für Globulin-, Albumin-, Stärke- und Eisenoxydsole[1]) angewendet.

[1]) Das Eisenoxydsol war durch ein mechanisches Dispersionsverfahren hergestellt (aus mineralischem Eisenoxyd) und wurden uns von Herrn Dr. *H. Karplus* in dankenswerter Weise zur Verfügung gestellt.

Bei hydrophoben Kolloiden tritt mit der fortschreitenden Elektrolytentfernung eine Flockung des Dispersoids ein, beispielsweise beim Eisenoxydsol.

Zusammenfassung.

1. Es wurde eine *Reinigungsmethode* für Kolloide ausgebildet, die der Verknüpfung von Ultrafiltration und Elektrodialyse entspricht: wir bezeichnen sie als *Elektro-Ultrafiltration*.

2. Sie gestattet in kürzester Zeit eine weitgehende Reinigung von Elektrolyten und hochdispersen Abbauprodukten. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Reinigungsmethoden wird eine *Konzentration der kolloiden Lösung* erreicht.

3. Die bei der Reinigung von Leim ausfallenden Eiweißstoffe wurden als *Globuline* identifiziert.

4. Es werden Beobachtungen über das Verhalten von Ultrafiltergeräten und Membranen mitgeteilt.

Auxowirkung eiweißfreier Kolloide auf die Harnstoffspaltung durch Soja-Urease.

Von

Gert Taubmann.

(Aus der medizinischen Klinik der Universität Breslau.)

(Eingegangen am 24. Januar 1925.)

Untersuchungen von *M. Falk*[1]) und *M. Jakoby*[2]) zeigten, daß dem Blutserum die Eigenschaft zukommt, die harnstoffspaltende Wirkung der Soja-Urease zu verstärken.

Jakoby wählte hierfür die Bezeichnung „Auxowirkung", ohne damit einen bestimmten Wirkungsmechanismus etwa im Sinne eines Aktivators andeuten zu wollen[3]). *Rona* und *György*[4]) konnten diesen Befund bezüglich des Serums bestätigen, wiesen aber darauf hin, daß diese Wirkung nur in langdauernden Versuchen deutlich werde, und daß die Wasserstoffionenkonzentration starken Einfluß auf das Ausmaß der fermentativen Spaltung habe, eine Feststellung, die *Lövgren*[5]) in seiner Arbeit erweiterte und bestätigte. *Rona* und *György* trugen dieser Tatsache durch Zusatz von Pufferlösung Rechnung. Eine befriedigende Erklärung der Auxowirkung konnten auch diese Autoren nicht geben. Sie zogen aber unter anderem die Möglichkeit in Erwägung, daß das Serum vermöge seiner Kolloide die Urease vor dem zerstörenden Einfluß des frei werdenden Ammoniaks schütze und so die Dauer der ungeschwächten Fermentwirkung verlängere. Sie gaben auch an, daß sie gelegentlich durch Zusatz von Gelatine einen Auxoeffekt erzielt hätten, doch seien diese Versuche „nicht immer reproduzierbar gewesen".

Es lag nun nahe zu untersuchen, inwieweit indifferente Kolloide imstande seien, eine Auxowirkung auszuüben, ohne damit sagen zu wollen, daß der Nachweis dieser Fähigkeit die Wirkung des Serums erschöpfend kläre. Vielmehr ist es wahrscheinlich, daß dieser ein ganzer

---

1) *Falk*, diese Zeitschr. **59**.
2) *Jakoby* und *Umeda*, ebendaselbst **68**.
3) *Jakoby*, ebendaselbst **140**.
4) *Rona* und *György*, ebendaselbst **111**.
5) *Lövgren*, ebendaselbst **119**. Hier auch umfassende Literaturangaben

Komplex von Einzelwirkungen zugrunde liegt, so die Wirkung des Calciums[1], des Glykokolls[2], die vielleicht überdies zu gegenseitiger Steigerung imstande sind.

Die Versuchsanordnung war dieselbe, wie sie von *M. Falk* in Anlehnung an die Vorschriften *Armstrongs*[3] beschrieben wird, mit der Abänderung, daß der Harnstoff in Phosphatmischung nach *Sörensen* von p_H 7,3 gelöst wurde. Damit wurde die Innehaltung der optimalen Wasserstoffionenkonzentration (7,3 bis 7,5) nach Möglichkeit gesichert. Bei sehr lebhafter Fermentwirkung reichte sie nicht aus, um eine Verschiebung in Richtung stärkerer Alkaleszenz zu verhindern; doch war dies bedeutungslos, da die Versuche von einer optimalen Basis ausgingen und die Konzentrationsverschiebung nie eine Milieuverbesserung darstellen konnte.

Als Ferment wurde ein zweistündiger wässeriger Extrakt (1 : 10) eines Sojamehlpräparats der Firma Riedel benutzt. Durch Zentrifugieren wurde die opaleszente Flüssigkeit von dem Bodensatz getrennt, filtriert und in Mengen von 0,5 ccm zum Versuch verwandt; das Ferment war in dieser Form sehr gut wirksam.

Zum Versuch wurden Erlenmeyerkolben von 200 ccm Fassungsvermögen benutzt. Die Stopfen waren doppelt durchbohrt, die durchgeführten Glasrohre mit Gummischläuchen und Klemmen armiert. Diese Kolben wurden mit 20 ccm der beschriebenen Harnstofflösung beschickt und die zu untersuchenden Substanzen zugegeben. Dazu kamen 0,5 ccm Fermentlösung, 2 ccm Olivenöl zum Verhindern des Schäumens und 3 Tropfen Toluol zur Konservierung. Um festzustellen, ob diese geringe Menge Toluol genügt, um eventuell vorhandene harnstoffspaltende Bakterien sicher zu vernichten, wurden in orientierenden Versuchen bedeutend größere Mengen Toluol zugesetzt (bis 3 ccm). Da die Spaltung bei dieser Versuchsanordnung nicht geringer war als in den mit wenig Toluol versetzten Kontrollen, konnte angenommen werden, daß Bakterienwirkung sicher ausgeschaltet sei. Für die Dauer des Versuchs wurden die Kolben im Brutschrank bei 37° C gehalten. Darauf Wasserdampfdestillation in eine Vorlage mit einer gemessenen Menge Normalschwefelsäure und Titration mit Normalnatronlauge unter Verwendung von Methylorange als Indikator. Diese Methode gibt hinreichend genaue Resultate; sie ist vollkommen ausreichend, um große Differenzen der NH_3-Werte, die allein beweisend sind, sicher erkennen zu lassen. Die Menge des abgespaltenen Ammoniaks wurde, wie üblich, in Kubikzentimeter n NH_3 ausgedrückt.

---

[1] *Hosakawa*, diese Zeitschr. **149**. *Kochmann*, ebendaselbst **151**.
[2] *Jakoby*, ebendaselbst **74**.
[3] *Armstrong, Horton*, Proc. Roy. Soc. **85**, Nr. 577, Mai 1922.

Zu den Versuchen wurden als kolloidale Zusätze Gummiarabikum und Stärke verwendet.

Die kolloidalen Eigenschaften des Gummiarabikums sind unter anderem von *Atzler* und *Lehmann*[1]) beschrieben, die es als Zusatz zu Blutersatzflüssigkeiten empfahlen, um eine Annäherung auch an die kolloidchemische Struktur des Serums zu erreichen. Der Stickstoffgehalt des hier verwendeten Präparats wurde nach *Kjeldahl* bestimmt; er betrug 0,056 Proz.

Die Stärke gehört zu den kolloidchemisch eingehend untersuchten Körpern. Über den kolloidalen Charakter ihrer Lösung berichtet *Freundlich*[2]). Der Stickstoffgehalt der Stärke betrug 0,011 Proz. Gegenüber dem Stickstoffgehalt der in den *Falk*schen Versuchen verwendeten Serummengen war er unerheblich; die Lösungen konnten praktisch als stickstofffrei angesehen werden.

Zum Versuch wurde das Gummiarabikum in 20proz. Lösung verwendet, von der 4 ccm der Harnstofflösung zugesetzt wurden.

Die Stärke wurde, weil relativ schlecht löslich, in Mengen von 1 g abgewogen und der Harnstofflösung zugegeben; das Wiegeschälchen wurde mit 4 ccm Wasser nachgespült. Der Kolben wurde dann im Wasserbad von 100° kurz erhitzt, wobei die Stärke leicht in Lösung ging. Dieses Verfahren war nötig, um die Flüssigkeitsmenge nicht allzusehr zu vergrößern. Eine Harnstoffspaltung fand hierbei, wie aus Tabelle I hervorgeht, höchstens innerhalb der Fehlergrenzen statt.

Tabelle I.

Bei sofortiger Destillation ergaben:

20 ccm U^+ 2 Proz. + 1 g Stärke + 4 ccm H_2O	0,2 n NH_3,
20 „ U^+ 2 „ + 1 g „ + 4 „ H_2O	0,15 n NH_3.

Zunächst wurde untersucht, ob etwa den auf Auxowirkung zu prüfenden Substanzen selbst eine harnstoffspaltende Wirkung zukommt.

Hierzu wurden je 20 ccm 2proz. Harnstofflösung mit Gummiarabikum und Stärke angesetzt, die Kontrolle erhielt 4 ccm Wasser. Dauer des Versuchs 40 Stunden.

Tabelle II.

Überall 20 ccm 2proz. Harnstofflösung. Bei Beginn des Versuchs p_H überall 7,3.

		n NH_3	p_H nachher
1	4 ccm Gummiarabikum	0,15	7,3
2		0,15	
3	1 g Stärke + 4 ccm H_2O	0,2	7,3
4		0,15	
5	4 ccm H_2O.	0,15	7,3
6		0,2	

[1]) *Atzler* und *Lehmann*, Deutsch. med. Wochenschr. 1923.
[2]) *Freundlich*, Kapillarchemie 1922.

Der Versuch zeigt, daß dem Gummiarabikum und der Stärke keine harnstoffspaltende Wirkung zukommt.

Im Hauptversuch wurde nun die Harnstofflösung mit den zu untersuchenden Substanzen und 0,5 ccm der Fermentlösung zusammengebracht.

Tabelle III.

Überall 20 ccm 2proz. U^+ + 0,5 ccm Fermentlösung.
Bei Versuchsbeginn überall p_H = 7,3.

	Dauer	Gummiarabikum		Wasser		Stärke	
	Std.	n NH_3 ccm	p_H nachher	n NH_3 ccm	p_H nachher	n NH_3 ccm	p_H nachher
1	12	4,3	7,4	4,3	7,5	4,2	7,4
		4,1		4,2		4,1	
2	20	5,3	7,3	5,6	7,4	6,4	7,5
		5,5		5,6		6,5	
3	36.	8,0	7,5	6,3	7,4	7,2	7,5
		7,9		6,1		7,4	
4	36	7,5	7,5	6,1	7,3	7,1	7,5
		7,5		6,5		7,3	
5	36	7,9		7,0		7,2	
		7,8		7,0		7,3	
6	36	6,9		5,5		6,5	
		7,1		5,4		6,3	
7	40	9,3	7,6	6,5	7,5	7,1	7,5
		8,9		6,5		7,0	
8	40	8,3	7,5	6,4	7,5	7,3	7,5
		8,5		6,5		6,8	
9	40	8,6		6,8		7,2	
		8,3		6,5		7,1	
10	40	8,7	7,5	7,1	7,3	8,5	7,6
		8,5		7,0		8,2	
11	40	7,6		7,1		8,0	
		7,7		7,2		8,0	
12	40	7,9		6,6		8,0	
		7,8		6,4		7,9	
13	60	10,1	7,5	9,1	7,6	9,5	7,6
		9,5		9,0		9,4	
14	60	9,1		8,8		9,2	
		9,4		8,9		9,5	

Die Auxowirkung der Zusätze kommt in den Versuchsreihen 3 bis 12 mit einer Dauer von 36 bzw. 40 Stunden deutlich zum Ausdruck. In kürzer dauernden Versuchen fehlt sie entweder ganz (Versuch 1) oder gibt ein atypisches Resultat (Versuch 2), wo die Fermentwirkung unter Stärkezusatz stärker, unter Gummiarabikum aber schwächer ist als in der Kontrolle.

In noch weiter ausgedehnten Versuchen (60 Stunden) ist ein Auxoeffekt wohl noch vorhanden, wird aber undeutlich, wohl deshalb weil die fermentative Spaltung so weit gegangen ist, daß sie sich den rechnerisch maximal zu erzielenden Werten nähert.

Der Befund, daß eine Auxowirkung erst in langdauernden Versuchen deutlich wird, stimmt überein mit den Feststellungen *Ronas* und *Györgys*, die dasselbe bei der Auxowirkung des Serums fanden.

Nachdem durch diesen Versuch erwiesen war, daß auch Körper vom Kohlehydratcharakter zu Auxowirkung befähigt waren, lag es nahe zu untersuchen, ob diese Eigenschaft von ihrer chemischen oder physikalischen Struktur abhängig sei. Es wurden daher einige echt lösliche Kohlehydrate auf Auxowirkung untersucht.

Tabelle IV.

Überall 20 ccm U^+ + 0,5 ccm Fermentlösung. Dauer 36 Stunden.

	n NH_3 ccm		n NH_3 ccm
4 ccm 20proz. Rohrzucker	6,5 6,2	4 ccm 20proz. Traubenzucker	6,3 6,5
4 ccm 20proz. Milchzucker	6,1 6,4	4 ccm Wasser	6,4 6,1

Der Versuch zeigt die Unwirksamkeit der zugesetzten Kohlehydrate. Damit ist zwar nicht bewiesen, aber wahrscheinlich gemacht, daß die Auxowirkung des Gummiarabikums und der Stärke auf ihrem kolloidalen Zustand beruht.

Zusammenfassung.

Es wird gezeigt, daß auch eiweißfreie Körper von kolloidalem Charakter imstande sind, die harnstoffspaltende Wirkung der Soja-Urease zu verstärken.

Beiträge zur Physiologie der Drüsen.

Von

Leon Asher.

Nr. 77.

Fortgesetzte Untersuchungen über die Abhängigkeit der Phagocytose von inneren Sekreten.

Von

Y. Abe.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 26. Januar 1925.)

Die Beziehungen zwischen Phagocytose und den Drüsen mit innerer Sekretion sind Gegenstand zweier voraufgehenden Arbeiten des Berner physiologischen Instituts gewesen, derjenigen von *Furuya*[1]) und derjenigen von *Masuno*[2]). *Furuya* hatte, ausgehend von Fragen der Konstitutionsphysiologie, die ersten grundlegenden Beobachtungen gemacht, welche wesentlich den Anteil der Schilddrüse an dem Vermögen der Leucocyten zur Phagocytose betreffen, und *Masuno* hatte diese Beobachtungen bestätigen und durch Einbeziehung der Milz erweitern können. Ferner hatte *Furuya* eine ganze Anzahl von Tatsachen beibringen können, welche dafür sprachen, daß nicht die Konstitution der weißen Blutkörperchen als solche sich verändert habe, vielmehr das Plasma, und daß die Eigenschaften der weißen Blutkörperchen hinsichtlich ihres Vermögens zu phagocytieren davon abhängen, mit welchem Plasma sie sich in Berührung befinden. Aber die Genauigkeit und der Umfang dieser Beziehung bedurfte noch einer speziellen und eingehenderen Untersuchung. Dazu waren nach dem Arbeitsplan, der auf Grund der neuen Entdeckung entstanden war, andere Drüsen mit innerer Sekretion auf ihre Beziehung zur Phagocytose zu untersuchen. Schließlich war die Methodik, durch welche die hier besprochenen Erscheinungen aufgedeckt worden waren, durch

---

[1]) *Furuya*, diese Zeitschr. **147**, 410, 1924.

[2]) *Masuno*, ebendaselbst **152**, 302, 1924.

neue Anordnungen zu überprüfen, dies um so mehr, als gewisse Einwände gegen die wesentlich von *Hamburger* und seinen Mitarbeitern geschaffene Methodik erhoben wurden. Allen genannten Aufgaben habe ich mich auf Anregung von Prof. *Asher* unterzogen.

Die Methodik bestand darin, bei Kaninchen ein steriles Exsudat in der Bauchhöhle zu erzeugen und die Exsudatzellen mit zu phagocytierenden korpuskulären Elementen und Sera, die von Tieren in verschiedenem funktionellen Zustand stammten, in Berührung zu bringen. Schließlich mußte ausgezählt werden, eine wie große Anzahl von Leucocyten unter einer gegebenen Gesamtzahl phagocytiert hatten.

Das sterile Exsudat wurde durch Injektion von 70 ccm einer sterilen Aleuronatlösung (Aleuronat 1, Wasser 100) in die Bauchhöhle von erwachsenen und möglichst großen Kaninchen erzeugt. Die zur Untersuchung dienenden Phagocyten gewann ich in der nachfolgenden Weise. Die 70 ccm steriler Aleuronatlösung wurden mit einem nicht zu engen, vorne abgestumpften Troikaröhrchen abends um 6 Uhr in die Bauchhöhle des Tieres hineingebracht. Die Injektion erfolgte durch eine sterile Spritze. Am nächsten Morgen um 9 Uhr wurde das Exsudat mit einer vorn abgestumpften Hohlnadel aus der Bauchhöhle herausgenommen. Das Tier war hierbei in Rückenlage aufgebunden, die Haare waren vorher entfernt worden und die Bauchhaut an der Einstichstelle mit Jodtinktur bepinselt. Nach der Aufsaugung des Exsudats wurde die Wunde mit Jodoformkollodium geschlossen. Wenn infolge verschiedener Umstände das Körpergewicht abnimmt, so nimmt damit auch das phagocytäre Vermögen stark ab. Solche Kaninchen müssen ausgeschaltet werden.

Den Leucocyten habe ich entweder Kohle oder Reismehl zugesetzt. Das käufliche Reismehl war zu den Versuchen zu grob und mußte daher verkleinert werden, wobei einige Schwierigkeiten zu überwinden waren. Da mit den gewöhnlichen Steingutmörsern eine genügende Feinheit aller Teilchen nicht zu erreichen war, mußte nach vorheriger Verreibung in Steingutmörsern das Reismehl in Achatmörsern zerrieben werden. Ich habe 6 Tage lang je 4 Stunden das Reismehl verrieben. Es gelingt auf diese Weise, die einzelnen Teilchen bis auf die Größe von roten Blutkörperchen herabzubringen. Das zerriebene Reismehl muß sehr trocken aufbewahrt werden und immer dann und wann auf seine Brauchbarkeit mikroskopisch untersucht werden.

Das Exsudat wurde in gewöhnlichen Gläsern und Zentrifugierröhrchen mit 0,7proz. Kochsalzlösung aufgenommen, in welcher 1,1proz., zitronensaures Natrium aufgelöst war, und 3 Minuten lang zentrifugiert. Nach Abhebung des größten Teiles der oberen Flüssigkeit wurde eine 0,9proz. Kochsalzlösung hinzugefügt, dann vorsichtig umgeschüttelt, wieder 2½ Minuten zentrifugiert, die Flüssigkeit abgehoben und aufs neue mit 0,9proz. Kochsalzlösung versetzt. Nach abermaligem Zentrifugieren wurde die Flüssigkeit fast wieder ganz entfernt, und schließlich wurden die Sedimente der verschiedenen Röhrchen miteinander vermischt. Von der so erhaltenen Phagocytensuspension wurden vermittels einer Kapillarpipette 0,2 ccm abgemessen und in 3 ccm der zu untersuchenden Flüssigkeit gebracht.

In meinen Versuchen waren das 0,9 Proz. Kochsalzlösung oder Serum bzw. in den Mischungen Reismehl und Kochsalzlösung jederzeit 0,1 ccm frisches, normales Kaninchenserum. Diese Lösungen befanden sich in ge-

wöhnlichen gläsernen zylindrischen Gefäßen von etwa 2 cm Durchmesser und 20 ccm Inhalt.

Das Serum wurde für den jeweiligen Versuch jederzeit frisch hergestellt. Niemals habe ich Serum von demjenigen Tier benutzt, welches gleichzeitig in dem betreffenden Versuch die Phagocyten zu liefern hatte. Nachdem die Phagocyten 30 Minuten lang der Einwirkung der zu untersuchenden Flüssigkeit bei Zimmertemperatur ausgesetzt gewesen waren, wurde eine gewisse Menge Reismehl oder Kohle hinzugesetzt. · Um eine möglichst gleichmäßige Verteilung in der Flüssigkeit herzustellen, wurden die Gläschen einige Male vorsichtig geschüttelt und dann 15 Minuten bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Sämtliche vollständig gleichbehandelte, mit Reismehl oder Kohlenphagocytensuspensionen gefüllte Zylindergläschen wurden sodann im Brutschrank einer Temperatur von 37° ausgesetzt und alle 10 Minuten aus dem Brutschrank genommen und vorsichtig hin und her bewegt, um eine dauernde gleichmäßige Mischung und Berührung von Reismehl oder Kohlepartikeln mit den Phagocyten aufrecht zu erhalten. Im ganzen verweilten die Gläschen 40 Minuten im Brutschrank. Hierauf wurden sie alle zur gleichen Zeit in den Eisschrank gebracht, und jedes Röhrchen wird mit 1 ccm 1 proz. Formollösung versetzt.

Nach Umschütteln habe ich die Reismehl- oder Kohlephagocytensuspension mit einer Kapillarpipette aufgenommen, 1 Tropfen davon auf den Objektträger gebracht und untersucht. Die Zählung erfolgte mittels Okularnetzmikrometers und verschiebbarem Objekttisch, wie er bei der Blutkörperchenzählung üblich ist.

Die angewandte Optik war Leitz Objektiv 8, Okular 3.

Außer der Bestimmung des phagocytären Vermögens mit Hilfe von Kohle oder Reismehl habe ich noch die Prozentzahl der Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben, festgestellt. Diese Zählungen fanden in einer Blutzählkammer statt, bei Anwendung von Reis wurde derselbe mit *Lugol*scher Lösung angefärbt.

Schließlich habe ich noch in einer ganzen Anzahl von Fällen histologisch das Zellbild der Exsudatzellen untersucht.

Das phagocytäre Vermögen der Exsudatleucocyten habe ich von normalen Tieren, von schilddrüsenlosen Tieren, von milzlosen Tieren, von ovarienlosen Tieren, von hodenlosen Tieren, von Tieren ohne Schilddrüse und Ovarium und von Tieren ohne Milz und Hoden untersucht. Die Operationen, über welche nichts weiter zu bemerken ist, fanden in der üblichen Weise unter aseptischen Maßnahmen statt. Die äußerste Strenge in der Asepsis ist ein unbedingtes Erfordernis, um zu verhüten, daß die Folgen entzündlicher Reaktionen auf die von mir zu beobachtenden Erscheinungen Einfluß gewinnen. Alle von mir benutzten Tiere waren daher auf ihren, abgesehen von dem gesetzten Defekt, unversehrten Zustand kontrolliert.

An jedem einzelnen Tiere wurden vor der Operation mehrfache Versuche angestellt, indem von ihnen in der oben geschilderten Weise Exsudatleucocyten entnommen wurden. Auf diese Weise habe ich

	Reismehl + NaCl + 0,1 Serum				NaCl + Kohle ohne Serum			
	Vor der Operation	Nach der Operation	Differenz	Prozent. Differenz	Vor der Operation	Nach der Operation	Differenz	Prozent. Differenz
Schilddrüse	10,6	4,8	5,8	54,7	25,5	17,3	8,2	32,1
Milz	12,3	8,3	4,0	32,5	25,1	20,3	4,8	19,1
Ovarium	9,6	8,2	1,4	13,0	31,5	24,0	7,5	23,[illegible]
Hoden	7,4	6,3	1,1	15,0	24,3	22,6	1,7	0,[illegible]
Schilddrüse u. Ovarium	14,2	6,5	7,7	54,2	31,3	19,2	12,1	38,[illegible]
Milz und Hoden	14,4	3,4	11,0	76,3	26,0	20,2	5,8	22,[illegible]
Durchschnitt	11,4	—	—	—	28,9	—	—	[illegible]

erstens eine größere Anzahl von normalen Kontrollversuchen gewonnen, und zweitens andererseits den individuellen Faktor der einzelnen Blutarten auf das phagocytäre Vermögen von Leucocyten nach Möglichkeit ausgeschaltet, indem immer jeweilig das gleiche Tier zum Vergleich vor und nach der Operation diente.

Das phagocytäre Vermögen wurde durch drei Reihen von Versuchsanordnungen geprüft. Die eine bestand darin, daß Reismehl den zu phagocytierenden Körper abgab, dem Reismehl wurde Kochsalzlösung zugesetzt und je 0,1 ccm normales Serum, weil Reismehl ohne Serumzusatz nicht oder kaum merklich phagocytiert wird. Die zweite Reihe bestand in Phagocytosenversuchen unter Anwendung von Kohle ohne Zusatz von Serum, welches bei Kohle überflüssig ist. Auf diese Weise habe ich in meinen Versuchen sowohl die von *Furuya*, wie auch die von *Masuno* benutzte Versuchsanordnung herangezogen. Die dritte Versuchsreihe bestand darin, daß ich von einem anderen Tiere stammendes normales Serum dem Reismehl zusetzte und das phagocytäre Vermögen vor und nach den Operationen unter Zusatz der gleichen Menge Normalserums feststellte. Der Serumzusatz war größer als in der früheren Versuchsreihe, die gleichfalls mit Reismehl angestellt wurde. Diese Versuchsreihe diente dazu, um erneut auf einer breiteren Basis über die Tatsache aufgeklärt zu werden, daß die Eigenschaften des Blutserums und nicht diejenigen der Leucocyten selbst es sind, die für das phagocytäre Vermögen maßgebend sind.

e.

ccm norm. Serum + Reismehl				Das relative histologische Blutbild der weißen Blutzellen im Exsudat		Prozentzahl der Makrophagen, welche polynucl. Leucocyten aufgenommen haben			
…peration	Nach der Operation	Differenz	Prozent. Differenz	Prozentzahl d. polymorphkern. Leucocyt. vor der Operation	Prozentzahl der Makrophagen nach der Operation	Vor der Operation	Nach der Operation	Differenz	Prozent. Differenz
2	39,1	7,1	15,4	82,5 77,7	17,4 22,2	14,0	7,3	6,7	48,0
6	38,4	6,2	14,0	79,2 67,4	20,8 32,5	15,3	11,2	4,1	26,9
3	40,9	5,4	11,4	82,7 80,1	17,3 19,8	14,8	9,4	5,4	36,9
1	41,3	1,8	0,41	79,5 74,4	20,5 25,6	13,2	11,2	2,0	15,1
7	37,4	11,3	23,0	83,9 80,0	16,1 20,0	13,9	4,4	9,5	68,0
4	35,7	6,7	15,0	85,5 75,5	14,4 24,5	13,0	7,1	5,9	45,3
1	—	—	—	—	—	14,0	—	—	—

Die Ergebnisse meiner Versuchsreihen bringe ich in einer größeren Anzahl von Tabellen, welche gemeinschaftlich als Anhang meiner Arbeit beigegeben sind. Sie enthalten außer den schon genannten Versuchsreihen noch die Zahlenwerte für das relative histologische Blutbild der weißen Blutzellen in dem Exsudat, sowie die Prozentzahl der Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten phagocytiert haben.

Der Einblick in die Ergebnisse meiner Versuche soll durch die vorstehende Übersichtstabelle, welche die durchschnittlichen Mittelwerte aller Versuche enthält, erleichtert werden.

Zunächst einmal wären Bemerkungen am Platze über die Größe der Phagocytose an normalen Tieren. Es zeigt sich, um zuerst die Versuche mit Kohle zu berücksichtigen, daß der durchschnittliche Wert der Anzahl phagocytierender Zellen 28,9 Proz. beträgt. Vergleiche ich diese Werte mit denjenigen von *Furuya*, so sind sie nicht wesentlich verschieden, denn er erhielt einen durchschnittlichen Wert von 30 Proz. derjenigen Phagocyten, welche unter gleichen Bedingungen, wie ich gearbeitet habe, Kohle aufgenommen haben. Meine Ergebnisse sind an einem sehr viel größeren Tiermaterial gewonnen, was natürlich die Sicherheit wesentlich erhöht.

In derjenigen Versuchsreihe, in welcher die Phagocytose unter Zusatz von Reismehl anstatt Kohle unter Zusatz von 0,1 ccm Serum untersucht wurde, beträgt der durchschnittliche Wert für die Prozentzahl von Phagocyten, welche phagocytiert haben, 11,4 Proz. Diese

Zahl läßt sich mit den von *Masuno* erzielten Ergebnissen deshalb nicht vergleichen, weil *Masuno* bei allen seinen Versuchen wegen der von ihm einzuhaltenden Versuchsbedingungen je 1 ccm Serum zusetzen mußte. Er erhielt dann zwischen 28 bis 20 Proz. Wohl aber kann ich dies mit meiner dritten Versuchsreihe, in welcher gleichfalls Reismehl als zu phagocytierender Körper benutzt wurde, aber je 0,5 ccm Normalserum zugesetzt wurden. In dieser Versuchsreihe ergibt sich eine Prozentzahl von 45,1 an Phagocyten, welche Reismehlpartikel aufgenommen haben. Dieser Wert ist erheblich größer als der früher von *Masuno* gefundene, trotzdem ich nur halb so viel Serum zugesetzt habe, wie er es getan hat. Ich schreibe den von mir ermittelten größeren Wert dem Umstande zu, daß ich die Technik der Präparation des Reismehls auf Grund der Erfahrungen, die wir im Institut gewonnen haben, noch weiter habe ausbilden können. Vergleicht man die mit 0,1 und 0,5 ccm Serumzusatz zum Reismehl gewonnenen Resultate miteinander, so sind sie für einen Einblick in die bei der Phagocytose maßgebenden Verhältnisse sehr instruktiv. Denn sie lehren sehr deutlich, welche überragende Bedeutung bei dem Phänomen der Phagocytose dem Serum zukommt.

Diese Erkenntnis war ja schon auf einem anderen Wege von *Masuno* erworben worden. Da sie aber von einer prinzipiellen Bedeutung ist, erschien es erforderlich, durch eine Ausdehnung der Versuche dieselbe sicherzustellen.

Die Reihe der Versuche, in denen ich die Prozentzahl der Makrophagen, welche polymorphkernige Leucocyten aufgenommen haben, bestimmt habe, ergibt als durchschnittlichen Wert 14 Proz. Die Bedingungen, unter welchen diese Art der Phagocytose stattfindet, sind nicht streng vergleichbar mit denjenigen, wo in vitro ein Zusatz von Kohle oder Reismehl stattfindet. Nichtsdestoweniger hat der Hinweis Interesse, daß die Durchschnittszahl von 14 Proz. phagocytierender Zellen nicht sehr viel verschieden ist von der Zahl 11,4 Proz. der Leucocyten, welche Reismehl in Kochsalzlösung unter Zusatz von 0,1 Proz. Serum phagocytieren. Als Ausdruck der physiologischen Phagocytose, unabhängig von den physikalischen Variablen, die bei Anwendung von Reismehl oder Kohle in Betracht kommen, ist die Phagocytose von körpereigenen Zellen, quantitativ bestimmt, eine willkommene Ergänzung der anderen Methode.

Ich gehe jetzt über zur Betrachtung der Ergebnisse meiner Bestimmungen nach Entfernung der oben genannten Drüsen mit innerer Sekretion. Den raschesten und aufklärendsten Überblick erhalten wir bei Betrachtung der prozentischen Differenzen der Phagocytose. In allen Fällen handelt es sich um eine Abnahme der Phagocytose nach der Operation.

Nach Exstirpation der Schilddrüse nahm das phagocytäre Vermögen der Leucocyten des schilddrüsenlosen Tieres, beurteilt nach der Methode der Anwendung von Reismehl in Kochsalz unter Zusatz von 0,1 ccm Serum, um 54 Proz. ab. Mit der Methode der Anwendung von Kohle und Kochsalzlösung ohne Serum betrug die Abnahme 33,1 Proz. Auch die physiologische Methode der Untersuchung der Makrophagen, welche die körpereigenen polynucleären Leucocyten phagocytieren, ergab sich die außerordentlich große Verminderung von 48 Proz. Aus diesen drei Ergebnissen geht mit großer Deutlichkeit erneut hervor, wie sehr der Verlust der Schilddrüse das phagocytäre Vermögen der Leucocyten herabsetzt. Diese Herabsetzung kommt selbst dann noch zum Vorschein, wenn man dem zu phagocytierenden Reismehl 0,5 ccm Normalserum hinzufügt. Dann beträgt die Verminderung immerhin noch 15,4 Proz. Diese Zahl dürfte resultieren aus dem Zusammenwirken des phagocytosesteigernden Einflusses von Normalserum und einer in dieser Versuchsreihe zum erstenmal deutlich hervortretenden Unterwertigkeit der Leucocyten selbst aus dem schilddrüsenlosen Organismus.

Die Exstirpation der Milz minderte das phagocytäre Vermögen gegenüber Reismehl in Kochsalzlösung unter Zusatz von 0,1 ccm Serum um 32,5 Proz., während die Phagocytose von Kohle ohne Zusatz von Serum um 19,1 Proz. gemindert wurde. Bei Zusatz von 0,5 ccm Serum war die Herabsetzung der Phagocytose von Reismehl immer noch 14 Proz. Die prozentische Verminderung der Phagocytose von polynucleären Leucocyten durch die Makrophagen betrug 26,9 Proz. Diese Versuchsreihe mit ihren eindeutigen Ergebnissen bestätigt vollständig die Angaben von *Masuno*, daß auch die Milzexstirpation von einer Herabsetzung des phagocytären Vermögens begleitet ist. Erneut wird hieraus klar, daß bei der Behandlung des Problems der sogenannten Wechselwirkung von Organen mit innerer Sekretion stets streng individuell Rücksicht auf die Funktion genommen werden muß, welche zur Beurteilung der Wechselwirkung herangezogen wird. Denn je nach der individuellen Funktion können zwei Organe in fördernder oder hemmender Wechselwirkung miteinander stehen. Auch in dieser Versuchsreihe finde ich Anhaltspunkte dafür, daß auch die Leucocyten selbst zur Veränderung des phagocytären Vermögens beitragen.

Auch die Exstirpation des Ovariums zeitigte eine merkliche Herabsetzung des phagocytären Vermögens, wenn auch nicht in dem Umfang wie die Exstirpation der Schilddrüse. Sehr klar tritt die Herabsetzung mit 36,9 Proz. bei der Betrachtung der Phagocytose durch die Makrocyten hervor. Wenn auch das Ovarium in gewissen Fällen wesentlich geringeren Einfluß auf die Phagocytose ausübt als die Schilddrüse, so ist derselbe immerhin noch ausgesprochen genug.

Noch geringfügiger ist der Einfluß des Hodens auf das phagocytäre Vermögen, wenigstens beurteilt nach der Phagocytose von Kohle und Serumzusatz und von den körpereigenen polynucleären Leucocyten. Der Unterschied im phagocytären Vermögen verschwindet praktisch ganz unter Zusatz von 0,5 ccm Serum zum Reismehl.

Die doppelte Entfernung von Schilddrüse und Ovarium hatte den zu erwartenden großen Einfluß der Herabsetzung des phagocytären Vermögens. Für jede der angewandten Methoden sind die Zahlen der prozentischen Herabsetzung entweder gleich groß oder sehr viel größer. Am deutlichsten ist das letztere an der Phagocytose der polymorphkernigen Leucocyten durch die Makrophagen, die nicht weniger als 68 Proz. beträgt.

Die Doppelentfernung von Milz und Hoden führte gleichfalls zu einer sehr erheblichen Herabsetzung des phagocytären Vermögens, in fast allen Versuchsreihen wesentlich größer als nach bloßer Exstirpation der Milz. Dies war um so auffallender als, wie wir gesehen haben, der Einfluß der Hodenexstirpation auf die Phagocytose der kleinste war.

Alle Einzelheiten der betrachteten Versuche finden sich in den Tabellen I bis XVIII.

In den folgenden Tabellen bedeutet: a die Anzahl der untersuchten Phagocyten; b die Anzahl der Phagocyten, welche Reismehl aufgenommen haben; c die Prozentzahl derjenigen Phagocyten, welche Reismehl oder Kohle aufgenommen haben.

Tabelle I.

Phagocytäres Vermögen (NaCl + 0,1 ccm n Serum + Reismehl, NaCl + Kohle, Serum + Reismehl) vor und nach der Operation.

Kaninchen 1, Körpergewicht 2850 g, weiblich, schwarz.

	Datum	Reismehl + 0,9 Proz. NaCl + 0,1 ccm norm. Serum				NaCl + Kohle				Norm. Serum + Reismehl			
		a	b	c		a	b	c		a	b	c	
		Mit Schilddrüse.											
Vor der Operat.	1. V.	712	73	10,2		717	187	26,0		733	343	46,8	
	7. V.	632	70	11,1	10,6	721	181	25,1	25,5	681	311	45,6	46,2
	15. V.	755	79	10,5		635	162	25,6		715	338	47,2	
		19. V. Schilddrüse entfernt, Körpergewicht 2500 g. Schilddrüsengewicht 350 mg.											
Nach der Operation	16. V.	1341	66	4,9		801	96	11,9		921	376	40,8	
	31. V.	685	31	4,5		712	109	15,3		624	253	40,5	
	5. VI.	708	39	5,5	4,8	733	90	12,2	17,3	272	110	40,4	39,1
	10. VI.	710	42	5,9		601	176	29,2		1075	373	34,6	
	16. VI.	604	23	3,8		719	130	18,0		610	240	39,3	

16. VI. Körpergewicht 2250 g.

Tabelle II.

Phagocytäres Vermögen (NaCl + 0,1 ccm n Serum + Reismehl, NaCl + Kohle, Serum + Reismehl) vor und nach der Operation.

Kaninchen 3, Körpergewicht 2570 g, weiblich, schwarz.

	Datum	Reismehl + 0,9 Proz. NaCl + 0,1 ccm norm. Serum				NaCl + Kohle				Norm. Serum + Reismehl			
		a	b	c		a	b	c		a	b	c	
		Mit Ovarium.											
Vor der Operation	3. V.	712	755	10,6	9,6	718	229	31,9	31,5	611	284	46,4	46,3
	8. V.	737	72	9,7		537	180	33,5		819	375	45,8	
	15. V.	615	54	8,8		604	176	29,1		711	334	46,9	
	20. V.	650	62	9,5		713	225	31,5		807	372	46,1	

28. V. Ovarium entfernt, Körpergewicht 2160 g.

Ovariumgewicht { rechts 0,08 g. links 0,07 g.

	Datum	a	b	c		a	b	c		a	b	c	
Nach der Operation	7. VI.	2004	184	9,1	8,2	1251	250	22,3	24,0	691	277	40,0	40,9
	12. VI.	801	78	9,6		970	219	22,6		733	280	38,1	
	18. VI.	724	44	6,0		772	181	23,4		776	332	42,7	
	24. VI.	771	59	7,6		693	193	27,8		543	234	43,0	
	30. VI.	607	54	8,8									

30. VI. Körpergewicht 1900 g.

Tabelle III.

Phagocytäres Vermögen (NaCl + 0,1 ccm n Serum + Reismehl, NaCl + Kohle, Serum + Reismehl) vor und nach der Operation.

Kaninchen 4, Körpergewicht 2920 g, männlich, grau.

	Datum	Reismehl + 0,9 Proz. NaCl + 0,1 ccm norm. Serum				NaCl + Kohle				Norm. Serum + Reismehl			
		a	b	c		a	b	c		a	b	c	
		Mit Hoden.											
Vor der Operation	5. V.	723	52	7,1	7,4	821	200	24,3	24,3	815	350	42,9	43,1
	10. V.	855	71	8,3		1297	280	21,5		761	310	40,7	
	17. V.	527	32	6,0		1119	268	23,9		739	325	43,9	
	24. V.	827	67	8,1		752	208	27,6		619	279	45,0	

30. V. Hoden entfernt, Körpergewicht 2650 g.

Hodengewicht { rechts 5,5 g. links 4,5 g.

	Datum	a	b	c		a	b	c		a	b	c	
Nach der Operation	9. VI.	1308	72	5,5	6,3	1934	354	18,3	22,6	1111	427	38,4	41,3
	17. VI.	780	48	6,1		964	224	23,2		851	353	41,4	
	23. VI.	1297	78	6,0		918	213	23,2		754	349	46,2	
	28. VI.	803	58	7,2		884	222	25,1		666	261	39,1	
	3. VII.	780	56	7,1		827	194	23,6		668	312	41,7	

3. VII. Körpergewicht 2400 g.

Tabelle IV.

Das relative histologische Blutbild der weißen Blutzellen in dem Exsudat, vor und nach der Operation.

Kaninchen 1, Körpergewicht 2850 g, weiblich, schwarz.

	Datum	Neutr. polymorphkern. Leucocyten		Makrophagen				
	Mit Schilddrüse.							
Vor der Operation	1. V.	1119	:	231	= 82,8	:	17,2	82,5 : 17,4
	5. V.	1202	:	199	= 85,7	:	14,3	
	15. V.	697	:	182	= 79,1	:	20,9	
	19. V. Schilddrüse entfernt.							
Nach der Operation	26. V.	657	:	120	= 84,5	:	15,5	77,7 : 22,2
	31. V.	452	:	101	= 81,7	:	18,3	
	5. VI.	564	:	195	= 74,3	:	25,7	
	10. VI.	565	:	236	= 70,5	:	29,5	

Tabelle V.

Das relative histologische Blutbild der weißen Blutzellen in dem Exsudat, vor und nach der Operation.

Kaninchen 3, Körpergewicht 2570 g, weiblich, schwarz.

	Datum	Neutr. polymorphkern. Leucocyten		Makrophagen				
	Mit Ovarium.							
Vor der Operation	3. V.	1141	:	219	= 83,8	:	16,2	82,7 : 17,3
	8. V.	1714	:	277	= 86,0	:	14,0	
	15. V.	942	:	258	= 78,5	:	21,5	
	28. V. Ovarium entfernt.							
Nach der Operation	7. VI.	1020	:	277	= 78,6	:	21,4	80,1 : 19,8
	12. VI.	905	:	210	= 81,1	:	18,9	
	18. VI.	597	:	162	= 78,6	:	21,4	
	24. VI.	709	:	237	= 74,9	:	25,1	
	30. VI.	998	:	140	= 87,6	:	12,4	

Tabelle VI.

Das relative histologische Blutbild der weißen Blutzellen in dem Exsudat, vor und nach der Operation.

Kaninchen 4, Körpergewicht 2920 g, männlich, grau.

	Datum	Neutr. polymorphkern. Leucocyten		Makrophagen				
	Mit Hoden.							
Vor der Operation	5. V.	650	:	161	= 80,1	:	19,9	79,5 : 20,5
	10. V.	572	:	191	= 74,9	:	25,1	
	17. V.	987	:	225	= 81,4	:	18,6	
	26. V.	1286	:	289	= 81,6	:	18,4	

Tabelle VI. (Fortsetzung.)

	Datum	Neutr. poly-morphkern. Leucocyten		Makro-phagen					
	30. V. Hoden entfernt.								
Nach der Operation	9. VI.	631	:	231	=	73,2	:	26,8	74,4 : 25,6
	17. VI.	673	:	284	=	70,4	:	29,6	
	23. VI.	1324	:	184	=	87,7	:	12,3	
	28. VI.	578	:	240	=	70,6	:	29,4	
	3. VII.	516	:	216	=	70,4	:	29,6	

Tabelle VII.

Prozentzahl der Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben, im Verhältnis zu allen untersuchten Makrophagen, in dem Exsudat, vor und nach der Operation.

Kaninchen 1, Körpergewicht 2850 g, weiblich, schwarz.

	Datum	Anzahl d. untersuchten Makrophagen		Anzahl d. Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben		Prozentzahl derjenigen Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben	
	Mit Schilddrüse.						
Vor der Operation	1. V.	231	:	33	=	14,2	14,0
	7. V.	199	:	26	=	13,0	
	15. V.	182	:	27	=	14,8	
	19. V. Schilddrüse entfernt.						
Nach der Operation	26. V.	120	:	10	=	8,5	7,3
	31. V.	101	:	7	=	6,9	
	5. VI.	195	:	16	=	8,2	
	10. VI.	236	:	14	=	5,9	

Tabelle VIII.

Prozentzahl der Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben, im Verhältnis zu allen untersuchten Makrophagen in dem Exsudat, vor und nach der Operation.

Kaninchen 3, Körpergewicht 2570 g, weiblich, schwarz.

	Datum	Anzahl d. untersuchten Makrophagen		Anzahl d. Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben		Prozentzahl derjenigen Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben	
	Mit Ovarium.						
Vor der Operation	3. V.	216	:	14	=	18,2	14,8
	8. V.	277	:	42	=	15,1	
	15. V.	258	:	29	=	11,2	
	28. V. Ovarium entfernt.						
Nach der Operation	7. VI.	277	:	31	=	11,1	9,4
	12. VI.	210	:	18	=	8,5	
	18. VI.	162	:	17	=	10,4	
	24. VI.	237	:	15	=	6,3	
	30. VI.	140	:	15	=	10,7	

Tabelle IX.

Prozentzahl der Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben, im Verhältnis zu allen untersuchten Makrophagen in dem Exsudat, vor und nach der Operation.

Kaninchen 4, Körpergewicht 2920 g, männlich, grau.

	Datum	Anzahl d. untersuchten Makrophagen		Anzahl d. Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben		Prozentzahl derjenigen Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben	
	Mit Hoden.						
Vor der Operation	5. V.	161	:	21	=	13,0	13,2
	10. V.	191	:	27	=	14,1	
	17. V.	225	:	33	=	14,6	
	24. V.	289	:	34	=	11,4	
	30. V. Hoden entfernt.						
Nach der Operation	9. VI.	231	:	25	=	10,8	11,2
	17. VI.	284	:	35	=	12,3	
	23. VI.	184	:	15	=	8,1	
	28. VI.	240	:	28	=	11,6	
	3. VII.	216	:	29	=	13,4	

Tabelle X.

Phagocytäres Vermögen (NaCl + 0,1 ccm n Serum + Reismehl, NaCl + Kohle, n Serum + Reismehl) vor und nach der Operation.

Kaninchen 6, Körpergewicht 2630 g, männlich, grau.

	Datum	Reismehl + 0,9 Proz. NaCl + 1 ccm norm. Serum a : b = c		NaCl + Kohle a : b = c		Norm. Serum + Reismehl a : b = c	
	Mit Milz + Hoden.						
Vor der Operation	19. VI.	713 : 101 = 14,1	14,4	711 : 178 = 25,1	26,0	736 : 317 = 43,0	42,4
	25. VI.	799 : 91 = 11,3		682 : 178 = 26,0		810 : 332 = 40,9	
	1. VII	567 : 101 = 17,6		704 : 182 = 25,8		663 : 281 = 42,3	
	5. VII.	721 : 106 = 14,8		822 : 224 = 27,2		771 : 333 = 43,1	
	11. VII. Milz + Hoden entfernt, Körpergewicht 2380 g, Milzgewicht 1,4 g, Hodengewicht rechts 5,0 g. links 5,5 g.						
Nach der Operation	16. VII.	1478 : 37 = 2,5	3,4	1175 : 240 = 20,4	20,2	905 : 264 = 29,1	35,7
	21. VII.	1061 : 48 = 4,5		1011 : 150 = 14,8		883 : 259 = 29,3	
	26. VII.	814 : 39 = 4,7		826 : 194 = 23,4		750 : 309 = 41,2	
	31. VII.	711 : 17 = 2,3		784 : 166 = 21,1		357 : 141 = 39,4	
	5. VIII.	410 : 14 = 3,4		772 : 168 = 21,7		673 : 217 = 39,6	

5. VIII. Körpergewicht 2020 g

Tabelle XI.

Phagocytäres Vermögen (NaCl + 0,1 ccm n Serum + Reismehl, NaCl + Kohle, n Serum + Reismehl) vor und nach der Operation.

Kaninchen 8, Körpergewicht 2800 g, weiblich, grau.

	Datum	Reismehl + 0,9 Proz. NaCl + 1 ccm norm. Serum				NaCl + Kohle				Norm. Serum + Reismehl			
		a	b	c		a	b	c		a	b	c	
	Mit Schilddrüse + Ovarium.												
Vor der Operation	20. VI.	1213	197	16,2	14,2	992	319	32,1	31,3	549	229	41,7	48,7
	26. VI.	812	110	13,5		654	195	29,8		949	503	53,0	
	2. VII.	750	89	11,8		1569	519	33,1		755	397	52,5	
	7. VII.	822	127	15,4		1408	424	30,1		732	349	47,6	
	11. VII. Schilddrüse + Ovarium entfernt, Körpergewicht 2520 g, Schilddrüsengewicht 320 g, Ovariumgewicht rechts 0,07 g, links 0,06 g.												
Nach der Operation	18. VII.	655	51	7,7	6,5	947	209	22,0	19,2	825	284	34,4	37,4
	23. VII.	792	40	5,0		1541	284	18,4		1165	428	36,7	
	28. VII.	590	40	6,7		1127	187	16,5		942	343	36,4	
	2. VIII.	731	48	6,5		992	178	17,8		705	272	38,5	
	7. VIII.	818	56	6,8		786	166	21,1		720	296	41,1	

7. VIII. Körpergewicht 2150 g.

Tabelle XII.

Phagocytäres Vermögen (NaCl + 0,1 ccm n Serum + Reismehl, NaCl + Kohle, n Serum + Reismehl) vor und nach der Operation.

Kaninchen 11, Körpergewicht 2550 g, männlich, schwarz.

	Datum	Reismehl + 0,9 Proz. NaCl + 1 ccm norm. Serum				NaCl + Kohle				Norm. Serum + Reismehl			
		a	b	c		a	b	c		a	b	c	
	Mit Milz.												
Vor der Operation	21. VI.	821	109	13,6	12,3	822	205	24,9	25,1	648	330	50,9	44,6
	27. VI.	713	101	14,1		651	172	26,4		610	265	43,4	
	4. VII.	777	84	10,8		1271	320	25,1		823	352	42,7	
	8. VII.	816	91	11,1		763	184	24,1		613	254	41,5	
	14. VII. Milz entfernt, Körpergewicht 2210 g, Milzgewicht 1,37 g.												
Nach der Operation	22. VII.	1130	95	8,4	8,3	1301	223	17,1	20,3	713	284	39,8	38,4
	29. VII.	792	64	8,0		953	214	22,4		1064	350	32,8	
	4. VIII.	839	70	8,4		1030	210	20,3		891	362	40,6	
	8. VIII.	668	66	9,8		1038	213	20,5		752	314	41,7	
	12. VIII.	713	51	7,1		780	168	21,5		656	244	37,1	

12. VIII. Körpergewicht 1820 g.

Tabelle XIII.

Das relative histologische Blutbild der weißen Blutzellen in dem Exsudat, vor und nach der Operation.

Kaninchen 6, Körpergewicht 2630 g, männlich, grau.

	Datum	Neutr. polymorphkern. Leucocyten		Makrophagen			
		Mit Milz + Hoden.					
Vor der Operation	19. VI.	1449	: 238	= 86,4	: 13,6	85,5 : 14,4
	25. VI.	1946	: 310	= 86,2	: 13,8	
	1. VII.	1022	: 189	= 84,3	: 15,7	
	5. VII.	970	: 168	= 85,2	: 14,8	
		11. VII. Milz + Hoden entfernt.				
Nach der Operation	16. VII.	782	: 206	= 79,1	: 20,9	75,5 : 24,5
	21. VII.	754	: 324	= 70,0	: 30,0	
	26. VII.	554	: 174	= 76,0	: 24,0	
	31. VII.	594	: 178	= 76,9	: 23,1	

Tabelle XIV.

Das relative histologische Blutbild der weißen Blutzellen in dem Exsudat, vor und nach der Operation.

Kaninchen 8, Körpergewicht 2800 g, weiblich, grau.

	Datum	Neutr. polymorphkern. Leucocyten		Makrophagen		
		Mit Schilddrüse + Ovarium.				
Vor der Operation	20. VI.	881	: 208	= 80,9	: 19,1	83,9 : 16,1
	26. VI.	719	: 98	= 88,1	: 11,9	
	2. VII.	833	: 173	= 82,6	: 17,4	
	7. VII.	635	: 117	= 84,4	: 15,6	
		11. VII. Schilddrüse + Ovarium entfernt.				
Nach der Operation	18. VII.	670	: 138	= 82,9	: 17,1	80,0 : 20,0
	27. VII.	595	: 161	= 78,7	: 21,3	
	28. VII.	483	: 104	= 82,2	: 17,8	
	2. VIII.	646	: 200	= 76,3	: 23,7	

Tabelle XV.

Das relative histologische Blutbild der weißen Blutzellen in dem Exsudat, vor und nach der Operation.

Kaninchen 11, Körpergewicht 2550 g, männlich, schwarz.

	Datum	Neutr. polymorphkern. Leucocyten		Makrophagen		
		Mit Milz.				
Vor der Operation	21. VI.	490	: 125	= 79,6	: 20,4	79,2 : 20,8
	27. VI.	751	: 218	= 77,5	: 22,5	
	4. VII.	765	: 92	= 87,3	: 12,7	
	8. VII.	636	: 243	= 72,4	: 27,6	

Tabelle XV. (Fortsetzung.)

	Datum	Neutr. poly-morphkern. Leucocyten		Makro-phagen					
	14. VII. Milz entfernt.								
Nach der Operation	22. VII.	765	:	165	=	82,2	:	17,8	67,4 : 32,5
	29. VII.	614	:	295	=	67,5	:	32,5	
	4. VIII.	656	:	270	=	70,8	:	29,2	
	8. VIII.	286	:	203	=	58,4	:	41,6	
	12. VIII.	466	:	332	=	58,3	:	41,7	

Tabelle XVI.

Prozentzahl der Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben, im Verhältnis zu allen untersuchten Makrophagen in dem Exsudat, vor und nach der Operation.

Kaninchen 6, Körpergewicht 2630 g, männlich, grau.

	Datum	Anzahl d. untersuchten Makrophagen		Anzahl d. Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben		Prozentzahl derjenigen Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben	
	Mit Milz + Hoden.						
Vor der Operation	19. VI.	321	:	37	=	11,2	13,0
	25. VI.	238	:	33	=	13,8	
	1. VII.	310	:	47	=	15,1	
	5. VII.	189	:	23	=	12,2	
	11. VII. Milz + Hoden entfernt.						
Nach der Operation	16. VII.	206	:	16	=	7,7	7,1
	21. VII.	324	:	20	=	6,1	
	26. VII.	174	:	16	=	9,1	
	31. VII.	178	:	10	=	5,5	

Tabelle XVII.

Prozentzahl der Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben, im Verhältnis zu allen untersuchten Makrophagen in dem Exsudat, vor und nach der Operation.

Kaninchen 8, Körpergewicht 2800 g, weiblich, grau.

	Datum	Anzahl d. untersuchten Makrophagen		Anzahl d. Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben		Prozentzahl derjenigen Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben	
	Mit Schilddrüse + Ovarium.						
Vor der Operation	20. VI.	208	:	30	=	14,5	13,9
	26. VI.	98	:	12	=	12,2	
	2. VII.	266	:	35	=	13,1	
	7. VII.	218	:	35	=	16,0	
	11. VII. Schilddrüse + Ovarium entfernt.						
Nach der Operation	18. VII.	138	:	6	=	4,5	4,4
	23. VII.	266	:	16	=	6,0	
	28. VII.	104	:	6	=	5,3	
	2. VIII.	228	:	5	=	2,4	

Tabelle XVIII.

Prozentzahl der Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben, im Verhältnis zu allen untersuchten Makrophagen in dem Exsudat, vor und nach der Operation.

Kaninchen 11, Körpergewicht 2550 g, männlich, schwarz.

	Datum	Anzahl d. untersuchten Makrophagen		Anzahl d. Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben		Prozentzahl derjenigen Makrophagen, welche polynucleäre Leucocyten aufgenommen haben	
	Mit Milz.						
Vor der Operation	21. VI.	125	:	16	=	12,8	15,3
	27. VI.	218	:	32	=	15,1	
	4. VII.	172	:	30	=	17,6	
	8. VII.	243	:	39	=	15,9	
	14. VII. Milz entfernt.						
Nach der Operation	22. VII.	168	:	19	=	11,3	11,2
	29. VII.	295	:	27	=	9,1	
	4. VIII.	270	:	23	=	8,5	
	8. VIII.	203	:	26	=	12,7	
	12. VIII.	332	:	48	=	14,4	

Die zweite Reihe meiner Versuche war einer Methodik gewidmet, mit deren Hilfe ich einerseits noch mehr als bisher den Einfluß der Individualität sowie getrennt den Einfluß etwaiger Abänderungen des Serums und der Leucocyten für sich einer Prüfung unterziehen konnte. Dementsprechend wurde ein Versuchsplan ausgearbeitet, der am besten an einem Beispiel klargemacht wird. Es mögen zur Untersuchung zwei Kaninchen, mit 1 und mit 2 bezeichnet, dienen. Dann werden dieselben unter folgender Gruppenanordnung benutzt.

a) Kaninchen-1-Serum — Kaninchen-2-Leucocyten.
b) Kaninchen-2-Serum — Kaninchen-1-Leucocyten.
c) Kaninchen-1-Serum — Kaninchen-1-Leucocyten.
d) Kaninchen-2-Serum — Kaninchen-2-Leucocyten.

Zuerst wurden die benutzten Tiere in dieser Weise im normalen Zustand untersucht, sodann nach der Operation, d. h. eins von beiden Tieren wurde operiert. Die vier soeben genannten Versuchsgruppen geben nun in folgender Weise einen Aufschluß über die beteiligten Faktoren. Nehmen wir z. B. die in Tabelle XIX protokollierten Versuche. Erst wird das phagocytäre Vermögen im Normalzustand festgestellt unter Berücksichtigung jedes Serums und der Leucocyten der beiden Tiere. Sodann wird Kaninchen 2 seiner Schilddrüse und seiner Hoden beraubt. Versuchsgruppe a) liefert den Erfolg von Zusammenbringen von Phagocyten des schilddrüsen- und hodenlosen Tieres mit dem Serum des Normaltieres. b) gibt den Erfolg auf das phagocytäre Vermögen des Zusammenbringens von Leucocyten des Normaltieres mit Serum des operierten Tieres. Gruppe c) dient als andauernder Kontrollversuch, in dem sowohl die Leucocyten wie das Serum von dem normalen Tiere stammen. Schließlich dient Gruppe d)

dazu, die Phagocytose unter den Doppeleinfluß der Abkunft sowohl der Leucocyten wie des Serums vom operierten Tiere zu prüfen.

In dieser ganzen Versuchsreihe habe ich mich ausschließlich des Reismehls und des Serums bedient. Reismehl habe ich benutzt, weil mich meine vorausgehenden Untersuchungen gelehrt hatten, daß die Beobachtungen am Reismehl sicherer sind als diejenigen an der Kohle. Serum habe ich genommen, weil man bei Anwendung von Serum die jeweilig erreichbaren Maximalwerte erhält.

Von jedem Kaninchen wurden 0,6 ccm Serum aus einem Ohrgefäß gewonnen. Sodann wurden vier Stück 10 ccm fassende Maßzylinder vorbereitet: Zylinder à 0,3 ccm Serum von Kaninchen 1 und 0,03 ccm genau abgemessener Leucocytensuspension von Kaninchen 2. Stehenlassen der Mischung 30 Minuten lang bei Zimmertemperatur, wobei jede 5 Minuten die Mischung hin und her bewegt wird; sodann Zusatz von 0,03 ccm Reismehlsuspension. Diese Mischung 15 Minuten lang bei Zimmertemperatur stehenlassen und jede 5 Minuten hin und her bewegen; sodann 40 Minuten lang verweilen im Wasserbade und die Mischung jede 10 Minuten hin und her bewegen. Schließlich wird der Zylinder in Wasser von 0° gebracht und ihm 0,2 ccm 1proz. Formalinlösung zugefügt. Zylinder b enthält 0,3 ccm Serum von Kaninchen 2 + 0,03 ccm Leucocytensuspension von Kaninchen 1 + 0,03 ccm Reismehlsuspension. Zylinder c enthält 0,3 ccm Serum von Kaninchen 1 und 0,03 ccm Leucocytensuspension von Kaninchen 1 + 0,03 ccm Reismehlsuspension. Zylinder d enthält 0,3 ccm Serum von Kaninchen 2 + 0,03 ccm Leucocytensuspension von Kaninchen 2 + 0,03 ccm Reismehlsuspension.

Die Tabellen, welche über die Ergebnisse dieser Versuchsreihe berichten (Tabellen XIX bis XXI), habe ich in folgender Weise angeordnet: Reihe 1 enthält die Anzahl der untersuchten Phagocyten, Reihe 2 enthält die Anzahl der Phagocyten, welche Reismehl aufgenommen haben, Reihe 3 gibt Prozentzahlen der Leucocyten, welche Reismehl aufgenommen haben, Reihe 4 enthält die durchschnittliche Prozentzahl der betreffenden Versuchsanordnung.

In allen meinen Versuchen habe ich von dem Moment, wo ich aus der Bauchhöhle die Leucocytensuspension herausgenommen habe, bis zu dem Moment, wo die gewaschenen Leucocyten in den Zylinder gebracht worden sind, genau 1½ Stunden gebraucht. Die Innehaltung genau gleicher Zeiten ist für vergleichende Versuche erforderlich, weil eine zeitliche Abnahme des phagocytären Vermögens stattfindet.

Tabelle XIX gibt in ihrem ersten Teile ein einheitliches Bild des normalen phagocytären Vermögens unter Bedingungen des oben genau beschriebenen wechselseitigen Zusammenbringens von Serum und Leucocytensuspension vom gleichen oder verschiedenen Kaninchen. Die durchschnittlichen Prozentzahlen für die Phagocytose unter den hier genannten Bedingungen, 57,4, 58,4, 60,4, 59,6 Proz. Die erhaltenen Werte geben in mehr als einer Richtung Aufschluß. Sie lehren, daß unter normalen Bedingungen in vier verschiedenen Reihen die gleichen

Tabelle XIX. Phagocytäres Verm
Alles Reismehl + Serum, d. h. 2 Tropfen Rei

	Datum	Kaninchen-1-Serum + Kaninchen-2-Leuco.		Kaninchen-2-Serum + Kaninchen-1-L	
				Mit Schild	
Vor der Operation	29. X.	797 : 452 = 57,9	57,4	1012 : 595 = 57,8	58,4
	8. XI.	841 : 496 = 58,9		1013 : 606 = 59,8	
	13. XI.	628 : 345 = 54,9		614 : 368 = 59,9	
	17. XI.	630 : 365 = 57,9		749 : 423 = 56,4	
				21. XI. Kaninchen 2 Sc	

	Datum	Kaninchen-1-Serum + Kaninchen-2-Leucocyten (d. h. norm. Serum + Op. Leuco.)		Kaninchen-2-Serum + Kaninchen-1-Leucocyten (d. h. Op. Serum + norm. Leu	
Nach der Operation	29. XI.	723 : 346 = 47,8	47,3	673 : 371 = 55,1	52,5
	1. XII.	651 : 316 = 48,5		729 : 370 = 50,7	
	3. XII.	755 : 321 = 42,5		776 : 397 = 51,1	
	8. XII.	664 : 336 = 50,6		691 : 368 = 53,2	

29. XI. Körpergewicht Kaninchen 1, männlich, 2370 g. Kaninchen 2, männlich, 23
21. XI. Körpergewicht Kaninchen 1 2315 g. Kaninchen 2 2200 g.

Tabelle XX. Phagocytäres Verm

	Datum	Kaninchen-5-Serum + Kaninchen-6-Leuco.		Kaninchen-6-Serum + Kaninchen-5-L	
				Mit Mi	
Vor der Operation	14. X.	741 : 397 = 53,5	55,1	534 : 296 = 55,4	57,1
	18. X.	522 : 276 = 52,8		657 : 386 = 58,7	
	23. X.	656 : 388 = 59,1		701 : 414 = 59,0	
	27. X.	756 : 418 = 55,2		818 : 454 = 55,5	
				28. X. Kaninch	

	Datum	Kaninchen-5-Serum + Kaninchen-6-Leucocyten (d. h. norm. Serum + Op. Leuco.)		Kaninchen-6-Serum + Kaninchen-5-Leucocyten (d. h. Op. Serum + norm. Leu	
Nach der Operation	5. XI.	810 : 333 = 41,1	43,9	739 : 386 = 52,2	50,0
	10. XI.	945 : 418 = 44,2		547 : 254 = 46,4	
	14. XI.	723 : 291 = 40,5		661 : 329 = 49,7	
	21. XI.	657 : 328 = 49,9		822 : 427 = 51,9	

14. X. Körpergewicht Kaninchen 5, weiblich, 2900 g. Kaninchen 6, weiblich, 2
28. X. „ „ 5, „ 2810 g. „ 6, „ 2
21. XI. „ „ 5, „ 2725 g. „ 6, „ 2

Tabelle XXI. Phagocytäres Vermö

	Datum	Kaninchen-7-Serum + Kaninchen-8-Leuco.		Kaninchen-8-Serum + Kaninchen-7-Le	
				Mit Mil	
Vor der Operation	3. XI.	651 : 383 = 58,8	55,8	789 : 432 = 54,7	54,2
	7. XI.	606 : 318 = 52,4		546 : 291 = 53,2	
	11. XI.	679 : 382 = 56,3		597 : 330 = 55,2	
	15. XI.	662 : 370 = 55,9		813 : 438 = 53,9	
				18. XI. Kaninch	

	Datum	Kaninchen-7-Serum + Kaninchen-8-Leucocyten (d. h. norm. Serum + Op. Leuco.)		Kaninchen-8-Serum + Kaninchen-7-Leucocyten (d. h. Op. Serum + norm. Le	
Nach der Operation	26. XI.	910 : 420 = 46,1	47,6	623 : 306 = 49,1	48,5
	29. XI.	815 : 371 = 45,5		677 : 305 = 45,0	
	2. XII.	761 : 375 = 49,2		769 : 357 = 46,4	
	6. XII.	548 : 273 = 49,8		611 : 328 = 53,6	

3. XI. Körpergewicht Kaninchen 7, weiblich, 2250 g. Kaninchen 8, weiblich, 2
18. XI. „ „ 7, „ 2160 g. „ 8, „ 2
6. XII. „ „ 7, „ 2115 g. „ 8, „ 2

r und nach der Operation.
spension (in 0,9 proz. NaCl) + 0,5 ccm Serum.

Kaninchen-1-Serum + Kaninchen-1-Leucocyten	Kaninchen-2-Serum + Kaninchen-2-Leucocyten
Hoden.	
612 : 389 = 63,5	705 : 441 = 62,5
711 : 437 = 61,5	772 : 460 = 59,6
558 : 325 = 58,2	443 : 245 = 55,3
745 : 435 = 58,4	509 : 312 = 61,2
} 60,4	} 59,6

ise – Hoden entfernt.

Kaninchen-1-Serum + Kaninchen-1-Leucocyten (d. h. norm. Serum + norm. Leucocyten)	Kaninchen-2-Serum + Kaninchen-2-Leucocyten (d. h. Op. Serum + Op. Leucocyten)
812 : 456 = 56,1	782 : 425 = 54,3
711 : 426 = 59,9	636 : 315 = 49,5
688 : 416 = 61,5	664 : 345 = 51,9
753 : 456 = 60,0	775 : 387 = 49,9
} 59,5	} 51,4

II. Körpergewicht Kaninchen 1 2255 g. Kaninchen 2 2245 g.   21. XI. Kaninchen 2 Hoden { rechts 5,3 g. links 3,5 g.   Schilddrüse 0,3 g.

r und nach der Operation.

Kaninchen-5-Serum + Kaninchen-5-Leucocyten	Kaninchen-6-Serum + Kaninchen-6-Leucocyten
hilddrüse.	
725 : 421 = 58,0	933 : 573 = 61,4
615 : 335 = 54,4	825 : 517 = 62,3
818 : 520 = 63,5	624 : 358 = 57,3
755 : 473 = 62,6	651 : 365 = 54,9
} 59,6	} 58,9

ilz + Schilddrüse entfernt.

Kaninchen-5-Serum + Kaninchen-5-Leucocyten (d. h. norm. Serum + norm. Leucocyten)	Kaninchen-6-Serum + Kaninchen-6-Leucocyten (d. h. norm. Serum + Op. Leucocyten)
571 : 322 = 56,0	518 : 241 = 46,5
599 : 334 = 55,7	592 : 279 = 47,1
779 : 484 = 62,1	899 : 463 = 51,5
823 : 485 = 58,9	766 : 373 = 48,6
} 58,1	} 48,4

. X. Kaninchen 6 Milz 1,35 g. Schilddrüse 0,3 g.

r und nach der Operation.

Kaninchen-7-Serum + Kaninchen-7-Leucocyten	Kaninchen-8-Serum + Kaninchen-8-Leucocyten
varium.	
684 : 421 = 61,5	1024 : 587 = 56,3
735 : 439 = 59,7	869 : 506 = 58,2
632 : 369 = 58,3	705 : 420 = 59,5
751 : 442 = 58,9	640 : 393 = 61,4
} 59,6	} 58,8

ilz + Ovarium entfernt.

Kaninchen-7-Serum + Kaninchen-7-Leucocyten (d. h. norm. Serum + norm. Leucocyten)	Kaninchen-8-Serum + Kaninchen-8-Leucocyten (d. h. Op. Serum + Op. Leucocyten)
521 : 287 = 55,0	777 : 391 = 50,3
653 : 387 = 59,2	815 : 452 = 55,4
818 : 494 = 60,4	733 : 349 = 47,6
755 : 456 = 60,3	621 : 329 = 52,9
} 58,7	} 51,5

. XI. Kaninchen 8 Milz 1,2 g. Ovarium { rechts 0,09 g. links 0,07 g.

Werte erhalten werden, was jedenfalls dafür spricht, daß die Methodik in konstanter Weise arbeitet. Sodann zeigen sie, daß die individuellen Unterschiede zwischen zwei Kaninchen, so lange sie normal sind, nicht so groß sein können, daß sie einen merklichen Unterschied im phagocytären Vermögen bedingen. Schließlich zeigt diese Reihe, daß die Vervollkommnung der Methodik bei Anwendung von Reismehl und Serum sehr hohe Werte für das phagocytäre Vermögen normaler Tiere liefert. Der zweite Teil der Tabelle XIX berichtet über die Größe des phagocytären Vermögens, nachdem bei Kaninchen 2 Schilddrüse und Hoden entfernt worden waren, während Kaninchen 1 als normales Kontrolltier blieb.

Es ergibt sich bei Zusammenbringen von Serum des Normaltieres und Leucocyten vom operierten Tiere ein phagocytäres Vermögen von 47,3 Proz., also eine Abnahme gegenüber der Normalreihe unter gleichen Bedingungen von 17,6 Proz. Bei Vermengung von Serum des operierten Tieres mit Leucocyten des Normaltieres ist der Prozentsatz des phagocytären Vermögens 52,5 Proz., demnach eine Herabsetzung von nur 10,1 Proz. Dieses Ergebnis ist insofern auffallend, als es von demjenigen *Furuyas* abweicht, welcher dem Serum eine größere Rolle zuschrieb als den Leucocyten. Meine beiden Versuchsreihen würden eher dafür sprechen, daß der Träger der Leucocyten den Leucocyten Eigenschaften aufprägt, die noch bestimmender für das phagocytäre Vermögen sind als das Serum. Bei der Wichtigkeit dieser Frage wird dieselbe noch an meinen anderen Versuchen zu prüfen sein. Der nächste Abschnitt des Versuchs gibt die Gelegenheit, die methodischen Bedingungen auf ihre Konstanz zu prüfen. Es zeigt sich bei wiederholter Anwendung von Serum und Leucocyten vom normalen Kontrolltier ein phagocytäres Vermögen von 59,5 Proz., ein Wert, der sich nur verschwindend unterscheidet von dem früheren Wert 60,4, einer früheren Periode unter genau den gleichen Bedingungen. Schließlich wird bei dem Zusammenbringen von Serum und Leucocyten des operierten Tieres ein phagocytäres Vermögen von 51,4 Proz. gefunden, demnach ein Unterschied von 13,9 Proz. Dieser Unterschied ist etwas kleiner als bei Verwendung von Serum vom Normaltier und Leucocyten vom operierten Tiere. Dieses Versuchsergebnis gestattet gleichfalls nicht, dem Serum des operierten Tieres einen irgendwie überwiegenden Einfluß zuzuschreiben.

Tabelle XX zeigt in den ersten vier Reihen bei den vier verschiedenen Anordnungen unter normalen Bedingungen fast die gleichen Werte des prozentischen phagocytären Vermögens untereinander und wie in der früheren Reihe, nämlich 55,1, 57,1, 59,6, 58,9 Proz. Ich mache darauf aufmerksam, daß es sich um zwei andere Tiere als in der früheren Versuchsreihe handelt. Wiederum zeigt sich, um das

gleich hier anzuschließen, daß, als in einer späteren Periode vom normalen Tiere Serum und Leucocyten genommen wurden, praktisch der gleiche Wert resultierte wie vorher, nämlich 58,1 gegenüber 59,6 Proz. Nach Vollendung der Normalreihen wurden bei Kaninchen 6 die Milz und die Schilddrüse entfernt. Die Herabsetzung des phagocytären Vermögens bei Zusammenbringen der Leucocyten vom operierten Tiere mit Normalserum betrug 20 Proz., während bei Zusammenbringen von normalen Leucocyten mit dem Serum des operierten Tieres die Herabsetzung 12,4 Proz. betrug und schließlich die Herabsetzung, wenn Serum und Leucocyten vom operierten Tiere stammten, den Wert von 17,9 Proz. erreichte. Das Wesentlichste an diesen Tatsachen ist folgendes: Die Herabsetzung des phagocytären Vermögens wird noch größer, wenn sowohl die Milz wie die Schilddrüse entfernt sind. Sodann zeigt sich der überwiegende Einfluß der Herkunft der Leucocyten. Schließlich gelangt wiederum das auffallende Ergebnis zur Beobachtung, daß, wenn Leucocyten und Serum vom gleichen Tiere stammen, die Herabsetzung der Phagocytose etwas kleiner ist, als wenn nur die Leucocyten vom operierten Tiere stammen.

Hier liegt vielleicht ein verwickelter Sachverhalt vor, zu dessen Erklärung ich folgende Hypothese vorbringen möchte. Ich nehme an, wie *Furuya*, daß einerseits das Serum eines seiner Schilddrüse oder seiner Milz beraubten Tieres unterwertig in bezug auf sein phagocytäres Vermögen sei. Daß aber andererseits die Leucocyten dem Eigenserum angepaßter sind als dem fremden Serum. Als die Resultate der beiden genannten Komponenten, deren Größe im einzelnen abgeschätzt werden kann, ergibt sich der anscheinend etwas paradoxe Sachverhalt.

Die letzte Versuchsreihe in Tabelle XXI zeigt wiederum bei den vier verschiedenen Anordnungen im normalen Zustand an zwei neuen Versuchstieren dieselben Größenwerte für das phagocytäre Vermögen untereinander wie bei den früheren Versuchsreihen. Sodann wurde bei Kaninchen 8 die Milz und das Ovarium entfernt. Bei Zusammenbringen von Leucocyten vom operierten Tiere und Normalserum verminderte sich das phagocytäre Vermögen um 15 Proz., während bei Zusammenbringen von Serum vom operierten Tiere mit Leucocyten vom Normaltier die Verminderung zwar ausgesprochen war, aber geringer als in der voraufgehenden Reihe, denn der prozentische Unterschied betrug nur 10,5 Proz. Das Zusammenbringen von Leucocyten und Serum vom operierten Tiere ließ wie früher einen Wert beobachten, der zwischen den beiden anderen lag, nämlich eine Verminderung von 12 Proz. Der auch in dieser Versuchsreihe angestellte Kontrollversuch ergab in zwei zeitlich verschiedenen Perioden bei Zusammenbringen

von Leucocyten und Serum vom gleichen Normaltier 7 in schönster Übereinstimmung 58,7 und 59,6 Proz.

Die vorstehende Untersuchung hat in Bestätigung und wesentlicher Erweiterung der früheren Mitteilungen aus dem Berner physiologischen Institut gezeigt, daß die Untersuchung des phagocytären Vermögens von Exsudatleucocyten eine schätzenswerte Quelle der Einsicht in ein neues Funktionsgebiet der Drüsen mit innerer Sekretion darstellt. Durch Anwendung einer verbesserten Methodik konnte die Erkenntnis gesichert werden, daß Schilddrüse, Ovarium und Milz einen sehr großen Einfluß auf das phagocytäre Vermögen ausüben. Hoden scheinen keinen sehr großen Einfluß zu besitzen. Erst wenn die Entfernung des Hodens mit derjenigen der Milz kombiniert wird, scheint sich der Einfluß der männlichen Geschlechtsdrüse geltend zu machen. Die durch die beiden Methoden der Auswertung des phagocytären Vermögens, nämlich der Anwendung von Kohle und von Reismehl, erhaltenen Ergebnisse konnten dadurch gestützt werden, daß sie die gleichen Verhältnisse ergaben, wenn das phagocytäre Vermögen durch die Phagocytose der polymorphkernigen Leucocyten von den Makrophagen des gleichen Exsudats geprüft wurde.

Bei normalen Tieren ergab sich ein verhältnismäßig sehr kleiner, ja sogar verschwindender Einfluß der Individualität der Versuchstiere der gleichen Art auf die Phagocytose. Hierdurch wird die Möglichkeit einer Fehlerquelle, herrührend von der Individualität, ausgeschlossen.

Als ein besonders wichtiges Ergebnis meiner Arbeit betrachte ich die neu gefundene Tatsache, die in einem gewissen Gegensatz zu den Befunden von *Furuya* steht, daß den Leucocyten als solchen nach Entfernung von Drüsen mit innerer Sekretion Unterwertigkeiten anhaften, welche ihr phagocytäres Vermögen herabsetzen. Ja, auf Grund meiner Beobachtungen komme ich zu dem Schluß, daß dieses zelluläre Moment der Konstitution noch schwerer wiegt als die Abänderung des Serums. Neue Ausblicke eröffnen sich angesichts dieser Feststellung, deren weitere Prüfung wir uns angelegen sein lassen werden.

Zusammengefaßt, sind die wichtigsten Ergebnisse der Arbeit die nachfolgenden:

1. Die Methode der Prüfung des phagocytären Vermögens von Exsudatleucocyten wurde durch geeignete Anwendungsweise von Reismehl für die Zwecke der Untersuchung der Beziehungen der Phagocytose und der Drüsen mit innerer Sekretion vervollkommnet.

2. Die Ergebnisse der beiden in-vitro-Methoden wurden durch quantitative Ermittlung der Phagocytose und polymorphkernigen Exsudatleucocyten durch die körpereigenen Makrophagen innerhalb der Bauchhöhle erweitert und gestützt.

3. Die Entfernung der Schilddrüse, der Milz, des Ovariums und des Hodens setzt das phagocytäre Vermögen herab, am stärksten wirkt in dieser Beziehung die Schilddrüse, am schwächsten der Hoden.

4. Die gleichzeitige Entfernung von Schilddrüse und Ovarium und von Schilddrüse und Milz erhöht die beobachtete Herabsetzung gegenüber der Einzeloperation nicht in einem sehr erheblichen Umfang.

5. Wird neben der Milz der Hoden noch entfernt, so zeigt sich die Einwirkung des Hodens deutlicher als bei der bloßen Hodenexstirpation.

6. Durch eine geeignete Versuchsanordnung — kreuzweise Benutzung von Serum und Leucocyten zweier Versuchstiere — wurde der etwaige Einfluß der Individualität auf die Resultate geprüft und als sehr gering befunden.

7. Bei dieser neuen Methode ergab sich mit großer Deutlichkeit, daß die Konstitution der Leucocyten an sich durch Entfernung von Drüsen mit innerer Sekretion unterwertig wird, so daß ihr phagocytäres Vermögen sinkt.

8. Es wird der Versuch gemacht, die Beobachtung zu erklären, daß die Serumeigenschaften einen geringeren Einfluß auszuüben scheinen als die Eigenschaften der Leucocyten selbst.

Untersuchungen über die Beziehungen zwischen Gallenabsonderung und Eierstöcken.

Von

Yuzuru Tominaga.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 26. Januar 1925.)

Mit 18 Abbildungen im Text.

Es liegen mannigfache klinische Erfahrungstatsachen vor, welche dafür sprechen, daß eine etwas nähere Beziehung zwischen den Ovarien und der Leberfunktion, insbesondere der Gallenfunktion besteht. Es scheint öfters beobachtet zu werden, daß Frauen, die Symptome von Gallenleiden zeigen, eine Steigerung des Leidens wahrnehmen lassen, wenn die Periode eintritt, oder wenn gar krankhafte Affektionen der Genitalorgane eintreten. Dieses waren die Anregungen, welche mich veranlaßten, auf Vorschlag von Prof. *Asher* die Beziehungen zwischen Gallenabsonderung und Ovarien unter physiologischen Bedingungen am Hunde zu untersuchen.

Der Plan der Arbeit bestand darin, an normalen Hunden eine Dauerfistel anzulegen und die Hunde mit Dauerfistel verschiedenen physiologischen Eingriffen zu unterziehen, und deren Einfluß auf die Gallenabsonderung festzustellen. Nachdem hinreichende Erfahrungen gewonnen worden waren, sollten die Ovarien entfernt und nach Entfernung der Ovarien die vorherigen Eingriffe wiederholt werden. Diese Methoden scheinen als einleitende die geeignetsten zu sein, um festzustellen, ob das Vorhandensein oder Fehlen der Ovarien einen bestimmenden Einfluß auf den Gang der Gallenabsonderung besitze. Zu den Versuchen dienten zwei passende weibliche Hunde. An diesen beiden Tieren wurde unter aseptischen Maßnahmen eine Gallenfistel in der nachfolgenden Weise angelegt. Es wurde ein bogenförmiger

Schnitt am rechten Rippenrand ausgeführt und die geschlossene Gallenblase durch eine Kornzange leicht herausgezogen und festgehalten. Der Ductus choledochus wurde in der Nähe dieses Eingriffs in das Duodenum in der Nähe seines Eintritts freigelegt, doppelt abgebunden und etwa ein 1 cm langes Stück zwischen den Abbindungen reseziert, um eine Verheilung des durchschnittenen Ganges nach Möglichkeit auszuschließen. Sodann wurde durch eine umlaufende Naht die Gallenblase einen Daumen breit unterhalb der Kuppe ringsherum fest mit dem Peritoneum vernäht. Hierauf wurde die Peritonealöffnung im übrigen sorgfältig verschlossen. Die Spitze der Gallenblase wurde eröffnet und der eröffnete Rand sowohl mit seiner Peritonealfläche als auch mit seinem umgeschlagenen Rande an die Haut vernäht. Im übrigen wurde die Wunde in bekannter Weise nach chirurgischen Grundsätzen versorgt. Der Wundverlauf war ein guter. Um der Verengerung des Kanals, welcher die Gallenblasenfistel umgab, entgegenzuwirken, wurde auch an solchen Tagen, wo ein Auffangen von Galle nicht stattfand, die Fistel katheterisiert.

Bei der über 4 Wochen sich erstreckenden Beobachtung an den beiden Hunden machte ich Erfahrungen, wie sie auch sonst zahlreich von denen gemacht worden sind, die Dauerfisteln an Hunden anlegten. Ohne ersichtlichen Grund treten merkwürdige Schwankungen, Unregelmäßigkeiten und Stockungen der Gallenabsonderung ein, Stockungen, die nachweislich nicht mit mechanischen Hindernissen in den Gallenwegen, soweit sie die Fistel betreffen, zusammenhängen. Wohl die bemerkenswerteste Beobachtung dieser Art, die ich gemacht habe, möchte ich gleich im Anfang meiner Arbeit mitteilen. Sie ist deshalb so beachtenswert, weil sie im allerengsten Zusammenhang steht mit dem Thema, welches ich bearbeitet habe.

Einige Zeit nach der Operation des einen Tieres, wo der Zustand des Tieres im übrigen ein ausgezeichneter war und die Gallenabsonderung sehr gut vonstatten ging, begann plötzlich die Gallenabsonderung ohne jeden mechanischen Grund sehr schlecht zu werden. Bei näherer Untersuchung des Tieres fand sich, daß das Tier gravide war. Es warf bald darauf sechs gesunde Junge ohne jede Störung seiner Gesundheit und war in der Lage, die Jungen zu säugen. Während der ganzen Zeit war die Gallenabsonderung außerordentlich schlecht, und sie blieb es, bis die Jungen abgenommen wurden. Von da an wurde die Gallenabsonderung wieder gut. Es darf wohl aus dieser Beobachtung der Schluß gezogen werden, daß hier ein experimenteller Beweis dafür vorliegt, daß der Zustand der Gravidität und seine Folgen von einer Verschlechterung der Gallenabsonderung begleitet sind. Ob diese

Verschlechterung der Gallenabsonderung mit mechanischen Momenten oder anderen zusammenhängt, läßt sich aus den Bedingungen meines Versuchs nicht erkennen. Es scheint mir aber kein zwingender Grund dafür vorzuliegen, daß die Stockung der Gallenabsonderung auf mechanischen Momenten beruhen müßte.

Zur Illustrierung des eben Gesagten will ich einige Versuchsprotokolle aus der eben besprochenen Zeit bringen.

Man sieht aus den Protokollen am Ende der Arbeit, daß am 3., 4., 5. und 7. Dezember eine ganz leidliche Gallenabsonderung bei Fütterung mit Fleisch und Pepton eintritt. Am 10. Dezember stellte ich die Gravidität fest. Am 12. Dezember fand die Geburt statt. Typisch für die erste Zeit der Geburt ist der Versuch vom 21. Dezember, trotz Zufuhr von 300 g Fleisch nur eine außerordentlich geringfügige Gallenabsonderung. Die Geringfügigkeit der Gallenabsonderung bleibt bis zum 23. Januar, wo das Tier aufhört, seine Jungen zu stillen. Nach dieser Zeit hebt sich die Gallenabsonderung wieder und es gibt Tage, an denen die Gallenabsonderung eine sehr erhebliche sein kann, so z. B. im Versuch vom 5. März.

Allerdings blieb bei diesem Tiere im großen ganzen die Gallenabsonderung geringfügig. Um der mangelnden Gallenabsonderung zu begegnen, die ja so häufig eintritt, ohne daß andere Ursachen dafür angegeben werden können, als das Aufhören der Gallenabsonderung in den Darm hinein, habe ich diesem Tiere Galle per os gegeben, diese Zufuhr habe ich so geregelt, daß Stunde für Stunde die Verhältnisse in dieser Beziehung konstant bleiben.

Meine Hauptversuche an diesem Tiere bestanden darin, daß ich drei Versuchsreihen anstellte. Eine Versuchsreihe in der das Tier Fleisch bekam, und zwar 200 g. Eine andere Versuchsreihe, in welcher das Tier 300 g Fettmilch, als Typus der Fetternährung, und eine Versuchsreihe, in welcher das Tier 300 g Brot erhielt. Die Ergebnisse dieser dritten Versuchsreihe gebe ich in Protokollen und Kurven.

Wechselnd, wie das Verhalten des Tieres während der ganzen Zeit vorher gewesen war, war es auch in dieser Hauptversuchsperiode, aber im großen ganzen kommt doch die Tatsache zum Ausdruck, daß die Zufuhr der drei Nahrungsmittel die Gallenabsonderung erheblich steigert. Merkwürdigerweise und nicht entsprechend der bisherigen Erfahrung hatte die Fleischernährung im großen ganzen eine geringere Steigerung der Gallenabsonderung als die Zufuhr von Fettmilch und die Zufuhr von Brot. Nichtsdestoweniger möchte ich nicht behaupten, daß die Unterschiede sehr charakteristische waren. Im

großen ganzen ist das Verhalten der Gallenabsonderung bei diesem Versuchstier bei den drei verschiedenen Nahrungsmitteln annähernd das gleiche.

Außer der Gallenabsonderung habe ich noch die Gesamtmenge des ausgeschiedenen Stickstoffs in der Galle bestimmt. Die gesamte ausgeschiedene Menge des Stickstoffs läuft im allgemeinen der Gesamtmenge parallel. Nachdem ich hinreichende Erfahrung über die Gallenabsonderung im normalen Zustande gewonnen habe, schritt ich zur doppelseitigen Ovariotomie. Dieselbe wurde nach bekannten Regeln aseptisch ausgeführt. Die Operation verlief normal, die Heilung gleichfalls. An diesem ovariotektomierten Tiere habe ich vom 27. März bis 16. April Versuche in der gleichen Art wie vorher angestellt, nur mit dem einzigen Unterschied, daß ich es nicht mehr für nötig befand, dem Tiere Galle zu geben. Meine Versuchsergebnisse gebe ich in den nachfolgenden Protokollen und kurvenmäßigen Darstellungen der Resultate. Sowohl der Typus der Gallenabsonderung, wie die absoluten Mengen blieben die gleichen in der Zeit vor der Ovariotomie, so daß aus dieser Versuchsreihe kein anderer Schluß gezogen werden kann als der, daß das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein des Ovariums keinen merklichen Einfluß auf die Größe der Gallenabsonderung ausübt.

Der zweite Hund, an dem ich meine Untersuchungen anstellte, brachte insofern andere und günstigere Resultate, als die Gallenabsonderung eine sehr viel größere war als bei dem ersten Hunde. Auch bei diesem Tiere habe ich drei verschiedene Versuchsreihen durchgeführt, die eine bei Zufuhr von 300 g Fleisch, die andere bei Zufuhr von 300 ccm Fettmilch und die dritte bei Zufuhr von 300 g Brot.

Die Ergebnisse dieser Versuchsreihe gebe ich in den nachfolgenden Protokollen und kurvenmäßigen Darstellungen.

In allen vier Versuchen, bei denen nach einer Vorperiode 200 g Fleisch gegeben wurden, war die Gallenabsonderung eine sehr starke. Bei den Versuchen mit Fettmilch ist es nur einer, wo die Steigerung eine ganz starke ist, während in den drei anderen Versuchen die Erhöhung zwar groß ist, aber doch nicht so groß wie nach Fleischernährung. Auch nach Broternährung prägt sich deutlich eine Steigerung der Gallenabsonderung aus, aber auch hier ist im großen ganzen die Größe der Gallenabsonderung etwas kleiner als nach Zufuhr von Fleisch. In dieser Versuchsreihe liegen die Verhältnisse annähernd so, wie sie am klarsten von *A. Barbèra* geschildert worden sind und wie sie auch häufig im physiologischen Institut in Bern beobachtet wurden. Ich halte die Art der Gallenabsonderung, wie ich sie hier an diesen zwei Hunden beobachtet habe, für die normale.

Am 26. März wurde an diesem Tiere die Ovariotomie ausgeführt, und ich habe vom 1. April an bis zum 28. April an diesem Tiere die gleichen Untersuchungen angestellt wie vor der Ovariotomie. Meine Versuchsergebnisse bringe ich in den bezüglichen Tabellen und kurvenmäßigen Darstellungen am Ende der Arbeit.

Im großen ganzen ist das Verhalten der Gallenabsonderung das gleiche wie vor der Zeit der Kastration. Sieht man sich die Einzelwerte der Größe der Gallenabsonderung in den einzelnen Perioden näher an, so sind die größten Steigerungen der Gallenabsonderung, trotzdem die Gallenabsonderung nach wie vor eine gute ist, nicht so hohe wie in der Periode vor der Kastration. Andererseits scheint die Gallenabsonderung im großen ganzen eine stetigere zu sein als vorher, aber die Unterschiede sind nicht so große, daß ich es wagen würde, daraufhin zu behaupten, daß die Ovariotomie einen Unterschied in der Gallenabsonderung bewirke. Im Gegenteil, ich komme zu dem Schluß, daß das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein des Ovariums ohne merklichen Einfluß auf die Größe der Gallenabsonderung ist.

In meiner Arbeit habe ich demnach zwei verschiedene Erfahrungen gemacht, die eine, welche darin besteht, daß das Auftreten der Schwangerschaft, der Gebärakt und das nachfolgende Säugen der Jungen einen sehr großen, und zwar hemmenden Einfluß auf die Größe der Gallenabsonderung ausübt. Die andere Tatsache besteht darin, daß das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein des Ovariums unter normalen Bedingungen keinen Einfluß auf die Größe der Gallenabsonderung ausübt. Vorausgesetzt, daß die häufig gehörte Behauptung der Kliniker zutreffend ist, daß Störungen im Ovarium mit Störungen der Lebertätigkeit einhergehen, ist diese Behauptung mit meinen Erfahrungen durchaus vereinbar. Es gehört ein gestörtes Funktionieren dazu, um die Leber in Mitleidenschaft zu ziehen, während das bloße Vorhandensein oder das bloße Fehlen ohne Einfluß ist.

Zusammengefaßt, sind die Ergebnisse meiner Arbeit die nachfolgenden:

1. Gravidität und Nachgeburtsperiode üben einen ungünstigen Einfluß auf die Größe der Gallenabsonderung aus.

2. Das Vorhandensein oder Nichtvorhandensein eines normalen Ovariums hat keinen merklichen Einfluß auf die unter physiologischen Bedingungen verlaufende Gallenabsonderung.

3. Letztere Tatsache steht nicht im Widerspruch mit der Erfahrung, daß Störungen des Ovariums mit Störungen der Lebertätigkeit verknüpft sind.

1. Hund.

Am 20. November 1923 Gallenfisteloperation ausgeführt.
Am 19. März 1924 Ovariotomie ausgeführt.

Versuch mit 200 g Ochsenfleisch (vor Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
10. I.	Vor Fütterung	0,3			bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,2			gelblichbräunlich
	2 „	0,6			
	3 „	2,2			dick blutig-schleimig
	4 „	5,6			klar bräunlich
	5 „	4,5			
	6 „	3,8			schwärzlichbräunlich
14. I.	Vor Fütterung	0,3			bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,1			
	2 „	0,1			dick bräunlich
	3 „	0,2			dünn bräunlich
	4 „	0,3			
	5 „	0,7			
	6 „	0,3			
16. I.	Vor Fütterung	0,3			bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,3			
	2 „	0,3			
	3 „	0,3			
	4 „	0,7			
	5 „	0,6			
	6 „	1,4			
	Stündlich 1 ccm Ochsengalle per os gegeben.				
17. I.	Vor Fütterung	0,2			gelblichbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,2			
	2 „	0,5			etwas grünlich
	3 „	0,7			gelblichbräunlich
	4 „	1,6			
	5 „	0,9			
	6 „	0,4			
	Stündlich 2 ccm Ochsengalle per os gegeben.				
18. I.	Vor Fütterung	1,0			dunkelbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,4			
	2 „	0,7			
	3 „	0,4			
	4 „	0,8			
	5 „	0,6			
	6 „	0,8			
	Stündlich 2 ccm Ochsengalle per os gegeben.				
21. I.	Vor Fütterung	1,3	0,308	4,004	gelblichbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	4,5	0,313	20,658	
	2 „	0,8			
	3 „	1,3			
	4 „	0,9	0,356	11,748	
	5 „	1,1			
	6 „	1,3			

Stündlich 5 ccm Galle gegeben.

Versuch mit 200 g Ochsenfleisch (vor Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
22. I.	Vor Fütterung	4,8	0,294	14,112	schwärzlichbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,3	0,357	12,138	gelblichbräunlich
	2 "	1,3			klar bräunlich
	3 "	1,8			
	4 "	4,0	0,376	36,096	
	5 "	2,6			
	6 "	3,0			
	Stündlich 5 ccm Galle gegeben.				
23. I.	Bis heute hat der Hund seine Jungen gestillt, aber nach und nach aufgehört.				
25. I.	Vor Fütterung	3,7	0,430	15,910	schwärzlichbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	1,5	0,338	19,604	bräunlich
	2 "	3,2			
	3 "	1,1			
	4 "	2,0	0,574	24,108	
	5 "	1,2			
	6 "	1,0			
	Stündlich 5 ccm Ochsengalle gegeben.				
28. I.	Vor Fütterung	0,7	0,252	1,764	bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,9	0,289	11,849	
	2 "	1,9			
	3 "	1,3			
	4 "	1,3	0,280	14,280	
	5 "	1,2			
	6 "	2,6			
	Stündlich 5 ccm Ochsengalle gegeben.				
30. I.	Vor Fütterung	1,1	0,357	3,92	bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	1,2	0,246	16,236	
	2 "	0,9			
	3 "	4,5			
	4 "	0,7	0,345	17,940	
	5 "	2,5			
	6 "	2,0			
	Stündlich 5 ccm Ochsengalle gegeben.				
31. I.	Vor Fütterung	1,3	0,273	3,510	klar bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	2,2	0,392	27,832	
	2 "	1,3			
	3 "	3,6			
	4 "	1,0	0,420	14,520	
	5 "	1,4			
	6 "	1,2			
	Stündlich 6 ccm Ochsengalle gegeben.				

Versuch mit 300 ccm Fettmilch (vor Ovariotomie).

Datum		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
1. II.	Vor Fütterung	2,5			dunkelbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	2,1			
	2 "	3,8			etwas bräunlich
	3 "	3,2			
	4 "	Da Hund unruhig und Galle etwas blutig geworden, habe ich aufgehört			
	Stündlich 5 ccm Galle gegeben.				

Versuch mit 300 ccm Fettmilch (vor Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
5. II.	Vor Fütterung	1,3			
	1 Std. nach Fütterung	0,7			
	2 „	0,8			
	3 „	0,3			
	4 „	Der Hund ganz unruhig geworden			
		Stündlich 5 ccm Galle gegeben.			
7. II.	Vor Fütterung	4,0			dunkelbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,8			
	2 „	0,5			
	3 „	1,2			
	4 „	0,2			leicht blutig
	5 „	0,2			
	6 „	0,8			
		Stündlich 5 ccm Galle gegeben.			
11. II.	Vor Fütterung	0,5			bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,5			stark blutig
	2 „	0,8			
	3 „	0,7			leicht blutig
	4 „	0,2			
	5 „	0,5			klar bräunlich
	6 „	0,9			
		Stündlich 5 ccm Galle gegeben.			

Versuch mit 300 g Brot (vor Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
21. II.	Vor Fütterung	5,6	0,263	14,728	
	1 Std. nach Fütterung	2,1			
	2 „	0,2	0,343	8,575	klar bräunlich
	3 „	0,2			
	4 „	0,3			
	5 „	0,2			
	6 „	0,8			blutig
		Stündlich 5 ccm Ochsengalle gegeben.			
25. II.	Vor Fütterung	4,6	0,280	12,880	
	1 Std. nach Fütterung	4,4			
	2 „	3,2	0,301	36,722	
	3 „	4,6			klar bräunlich
	4 „	5,1			
	5 „	12,7	0,385	133,980	
	6 „	17,0			
		Stündlich 5 ccm Ochsengalle gegeben.			
26. II.	Vor Fütterung	1,8			bräunlich
	1 Std. nach Fütter.	2,0			blutig
	2 „	3,5			
	3 „	Der Hund unruhig geworden			
		Stündlich 5 ccm Galle gegeben.			

Versuch mit 300 g Brot (vor Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
3. III.	Vor Fütterung	2,0			bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,7			
	2 „	1,0			dick bräunlich blutig
	3 „	0,5			
	4 „	0,3			
	5 „	0,8			stark blutig
	6 „				

Stündlich 5 ccm Galle gegeben.

Versuch mit 200 ccm Fettmilch (vor Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
13. II.	Vor Fütterung	1,2	0,679	8,148	schwärzlichbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,2			
	2 „	0,1	0,413	13,629	dick schleimig
	3 „	3,0			
	4 „	7,0			
	5 „	3,6	0,391	65,294	klar bräunlich
	6 „	6,1			

Stündlich 5 ccm Galle gegeben.

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
15. II.	Vor Fütterung	1,5			
	1 Std. nach Fütter.	0,1			
	2 „	0,6			gelblichbräunlich
	3 „	0,8			

Stündlich 5 ccm Galle gegeben.
Da der Hund sehr unruhig wurde, habe ich mit meinen Versuchen aufgehört.

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
19. II.	Vor Fütterung	3,1	0,560	17,360	schwärzlichbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	2,3			
	2 „	4,0	0,413	36,344	
	3 „	2,5			klar bräunlich
	4 „	6,5			
	5 „	3,7	0,508	76,200	schwärzlichbräunlich
	6 „	4,8			

Stündlich 5 ccm Ochsengalle per os gegeben.

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
5. III.	Vor Fütterung	5,6	0,403	22,568	schwärzlichbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	4,3			
	2 „	1,9	0,466	52,658	etwas dick
	3 „	5,1			
	4 „	7,1			
	5 „	6,5	0,413	72,688	klar bräunlich
	6 „	4,0			

Stündlich 5 ccm Galle gegeben.

Versuch mit 300 g Brot (vor Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
7. III.	Vor Fütterung	5,1	0,413	21,063	
	1 Std. nach Fütterung	2,2			
	2 „	4,6	0,420	42,000	
	3 „	3,2			dunkelbräunlich
	4 „	1,8			
	5 „	0,7	0,315	9,450	
	6 „	0,5			

Stündlich 5 ccm Ochsenfleisch per os gegeben.

Versuch mit 300 g Brot (vor Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
13. III.	Vor Fütterung	8,3	0,203	16,849	sehr dünn bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	2,5			
	2 „	0,8	0,186	8,370	dick schleimig
	3 „	1,2			
	4 „	0,1			etwas getrübt
	5 „	0,7			
	6 „	0,8			etwas blutig
			Ohne Galle.		
17. III.	Vor Fütterung	3,9	0,336	13,004	dünn bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,8			
	2 „	0,5	0,420	3,140	dick bräunlich
	3 „	0.4			
	4 „	0,3			
	5 „	1,1	0,422	16,458	dünn bräunlich
	6 „	2,5			schwärzlichbräunlich
			Ohne Galle.		

Versuch mit 200 g Ochsenfleisch (nach Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
27. III.	Vor Fütterung	1,8	0,167	3,006	
	1 Std. nach Fütterung	1,2			
	2 „	0,8	0,172	12,728	
	3 „	5,4			sehr dünn gelblichbräunlich
	4 „	2,4			
	5 „	0,7	0,263	12,098	
	6 „	1,5			
			Ohne Galle.		
2. IV.	Vor Fütterung	1,9	0,266	5,054	dünn gelblichbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	2,2			
	2 „	1,6	0,270	11,610	
	3 „	0,5			
	4 „	0,4			dick schleimig
	5 „	0,7	0,287	5,166	
	6 „	0,7			
			Ohne Galle.		
10. IV.	Vor Fütterung	1,1	0,312	3,432	dunkelbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	1,2			
	2 „	0,5	0,476	9,52	dick bräunlich
	3 „	0,3			
	4 „	0,6			
	5 „	0,6	0,452	7,684	dick schleimig
	6 „	0,5			
			Ohne Galle.		

Versuche mit 300 g Fettmilch (nach Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
28. III.	Vor Fütterung	1,2	0,749	8,988	dunkelbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,8			
	2 „	0,6	0,693	15,246	dünn bräunlich
	3 „	0,8			
	4 „	2,5			
	5 „	2,2	0,518	49,210	dunkelbräunlich
	6 „	4,8			
			Ohne Galle.		

Versuch mit 300 ccm Fettmilch (nach Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
4. IV.	Vor Fütterung	3,0	0,483	14,49	dunkelbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	10,7			
	2 "	0,7	0,312	38,688	
	3 "	1,0			dünn bräunlich
	4 "	0,8			
	5 "	1,4	0,679	23,086	
	6 "	1,2			dunkelbräunlich
			Ohne Galle.		
14. IV.	Vor Fütterung	2,9	0,340	9,86	gelblichbräunlich
	1 Std. nach Fütterung	0,8			
	2 "	1,2	0,350	8,40	dick zäh-schleimig
	3 "	0,4			gelblich
	4 "	1,1			fast farblos
	5 "	0,6	0,203	4,669	dick schleimig
	6 "	0,6			
			Ohne Galle.		

Versuch mit 300 g Brot (nach Ovariotomie).

31. III.	Vor Fütterung	3,7	0,427	15,799	
	1 Std. nach Fütterung	2,9			dunkelbräunlich
	2 "	0,9	0,501	28,557	
	3 "	1,9			klar bräunlich
	4 "	1,8			
	5 "	0,5	0,368	10,304	dunkelbräunlich
	6 "	0,5			
			Ohne Galle.		
8. IV.	Vor Fütterung	1,3			leicht blutig
	1 Std. nach Fütterung	2,2			
	2 "	0,2			
	3 "	0,2			gelblichbräunlich
	4 "	0,4			
	5 "	1,1			
	6 "	0,8			etwas blutig
			Ohne Galle.		
16. IV.	Vor Fütterung	1,0	0,567	5,67	
	1 Std. nach Fütterung	2,8			
	2 "	7,1	0,448	48,832	
	3 "	1,0			schwärzlichbräunlich
	4 "	1,4			
	5 "	1,4	0,504	18,648	
	6 "	0,9			
			Ohne Galle.		

2. *Hund.*

Am 15. Januar 1924 Gallenfisteloperation ausgeführt.
Am 26. März 1924 Ovariotomie ausgeführt.

Versuch mit 200 g Fleisch (vor Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
14. II.	Vor Fütterung	4,0	0,098	3,92	klar bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	10,5	0,070	26,39	
	2 „	9,5			
	3 „	17,7			
	4 „	19,7	0,068	38,488	
	5 „	17,4			
	6 „	19,5			
		Ohne Galle.			
6. III.	Vor Fütterung	3,7	0,095	3,515	klar bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	6,6	0,084	20,412	
	2 „	9,5			
	3 „	8,2			
	4 „	8,4	0,116	27,956	
	5 „	8,2			
	6 „	7,5			
		Ohne Galle.			
14. III.	Vor Fütterung	5,8	0,123	7,134	klar bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	8,1	0,200	44,8	
	2 „	7,2			
	3 „	7,5			
	4 „	8,1	0,165	34,320	
	5 „	7,0			
	6 „	5,7			
		Ohne Galle.			
21. III.	Vor Fütterung	7,3	0,112	8,176	bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	11,5	0,063	21,672	
	2 „	11,5			
	3 „	11,4			
	4 „	9,9	0,077	21,252	
	5 „	8,8			
	6 „	8,9			
		Ohne Galle.			

Versuch mit 300 ccm Fettmilch (vor Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
22. II.	Vor Fütterung	5,5	0,112	6,16	bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	5,0	0,119	48,076	
	2 „	17,7			
	3 „	17,7			
	4 „	13,0	0,123	49,44	
	5 „	9,6			
	6 „	17,6			
		Ohne Galle.			

Versuch mit 300 ccm Fettmilch (vor Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
10. III.	Vor Fütterung	4,4	0,158	6,952	klar bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	2,3			
	2 „	8,0	0,126	23,31	
	3 „	8,2			
	4 „	7,4			
	5 „	5,8	0,172	30,96	
	6 „	4,8			
			Ohne Galle.		
18. III.	Vor Fütterung	3,5	0,147	5,145	klar bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	4,4			
	2 „	5,8	0,176	28,16	
	3 „	5,8			
	4 „	5,7			
	5 „	5,6	0,151	24,764	
	6 „	5,1			
			Ohne Galle.		
24. III.	Vor Fütterung	4,5	0,144	6,48	klar bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	7,5			
	2 „	7,2	0,123	27,552	
	3 „	7,7			
	4 „	6,0			
	5 „	6,2	0,154	26,488	
	6 „	5,0			
			Ohne Galle.		

Versuch mit 300 g Brot (vor Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
4. III.	Vor Fütterung	5,0	0,165	8,25	klar bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	7,1			
	2 „	9,0	0,130	27,69	
	3 „	5,2			
	4 „	6,4			
	5 „	6,7	0,133	25,137	
	6 „	5,8			
			Ohne Galle.		
12. III.	Vor Fütterung	4,6	0,154	7,084	klar bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	6,3			
	2 „	4,2	0,196	34,300	
	3 „	7,2			
	4 „	4,9			
	5 „	4,7	0,147	23,079	
	6 „	6,1			
			Ohne Galle.		
20. III.	Vor Fütterung	5,0	0,147	7,35	klar bräunlich
	1 Std. nach Fütterung	5,0			
	2 „	10,3	0,132	32,868	
	3 „	9,6			
	4 „	7,9			
	5 „	6,2	0,116	23,296	
	6 „	6,5			
			Ohne Galle.		

Versuch mit 300 g Brot (vor Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
25. III.	Vor Fütterung	3,5	0,175	6,125	
	1 Std. nach Fütterung	5,7			
	2 „	8,0	0,098	19,6	
	3 „	6,3			klar bräunlich
	4 „	6,6			
	5 „	6,9	0,109	19,947	
	6 „	4,8			

Ohne Galle.

Versuch mit 200 g Ochsenfleisch (nach Ovariotomie).

1. IV.	Vor Fütterung	5,0	0,161	8,050	
	1 Std. nach Fütterung	8,1			
	2 „	9,2	0,105	26,355	
	3 „	7,8			klar bräunlich
	4 „	7,6			
	5 „	6,8	0,123	26,076	
	6 „	6,8			

Ohne Galle.

9. IV.	Vor Fütterung	3,2	0,133	4,256	
	1 Std. nach Fütterung	7,5			
	2 „	9,3	0,088	22,616	
	3 „	8,9			klar bräunlich
	4 „	7,4			
	5 „	5,5	0,119	20,111	
	6 „	4,0			

Ohne Galle.

17. IV.	Vor Fütterung	5,5	0,102	5,610	
	1 Std. nach Fütterung	6,7			
	2 „	6,8	0,109	22,127	
	3 „	6,8			klar bräunlich
	4 „	8,8			
	5 „	9,2	0,112	31,248	
	6 „	9,9			

Ohne Galle.

22. IV.	Vor Fütterung	6,0	0,140	8,400	
	1 Std. nach Fütterung	9,7			
	2 „	10,3	0,102	30,396	
	3 „	9,8			klar bräunlich
	4 „	9,5			
	5 „	7,6	0,102	27,642	
	6 „	10,0			

Ohne Galle.

Versuch mit 300 ccm Fettmilch (nach Ovariotomie).

3. IV.	Vor Fütterung	4,3	0,147	6,321	
	1 Std. nach Fütterung	5,9			
	2 „	6,2	0,102	18,870	
	3 „	6,4			klar bräunlich
	4 „	7,7			
	5 „	6,3	0,130	24,700	
	6 „	5,0			

Ohne Galle.

Versuch mit 300 ccm Fettmilch (nach Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
11. IV.	Vor Fütterung	3,0	0,179	5,370	
	1 Std. nach Fütterung	8,0			
	2 „	7,0	0,123	25,707	
	3 „	5,9			klar bräunlich
	4 „	6,7			
	5 „	5,9	0,137	25,756	
	6 „	6,2			
			Ohne Galle.		
23. IV.	Vor Fütterung	5,0	0,154	7,70	
	1 Std. nach Fütterung	6,7			
	2 „	6,1	0,144	26,928	
	3 „	5,9			klar bräunlich
	4 „	7,9			
	5 „	7,4	0,126	27,468	
	6 „	6,5			
			Ohne Galle.		
25. IV.	Vor Fütterung	6,0	0,126	7,56	
	1 Std. nach Fütterung	5,6			
	2 „	6,4	0,119	21,063	
	3 „	5,7			klar bräunlich
	4 „	8,2			
	5 „	6,8	0,109	25,288	
	6 „	8,2			
			Ohne Galle.		

Versuch mit 300 g Brot (nach Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
7. IV.	Vor Fütterung	5,0	0,133	6,65	
	1 Std. nach Fütterung	6,1			
	2 „	7,3	0,091	18,291	
	3 „	6,7			klar bräunlich
	4 „	5,7			
	5 „	6,2	0,126	22,554	
	6 „	6,0			
			Ohne Galle.		
15. IV.	Vor Fütterung	5,0	0,112	5,60	
	1 Std. nach Fütterung	6,7			
	2 „	8,0	0,120	26,04	
	3 „	7,0			klar bräunlich
	4 „	6,8			
	5 „	6,7	0,120	25,44	
	6 „	7,7			
			Ohne Galle.		
24. IV.	Vor Fütterung	6,0	0,126	7,56	
	1 Std. nach Fütterung	5,9			
	2 „	6,8	0,140	26,600	
	3 „	6,3			klar bräunlich
	4 „	7,3			
	5 „	7,6	0,119	27,251	
	6 „	8,0			
			Ohne Galle.		

Versuch mit 300 g Brot (nach Ovariotomie).

Datum 1924		Menge ccm	N Proz.	Gesamt-N mg	Bemerkungen
28. IV.	Vor Fütterung	6,3	0,102	6,226	klar bräunlich
	nach Fütterung 1 Std.	8,9	0,088	21,12	
	2 „	8,3			
	3 „	6,8			
	4 „	7,1	0,098	22,736	
	5 „	7,9			
	6 „	8,2			

Ohne Galle.

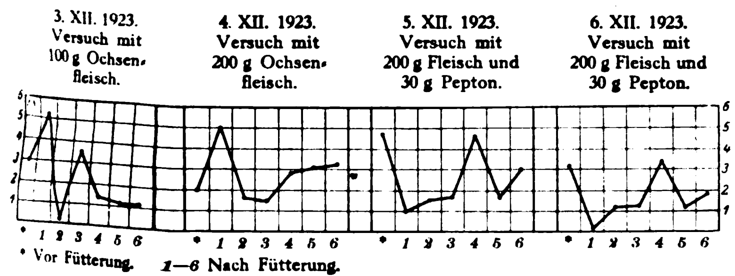


Abb. 1. Vor Ovariotomie (Schwangerschaft).

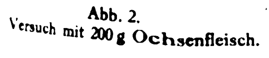
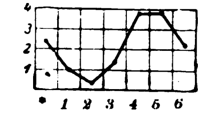


Abb. 2. Versuch mit 200 g Ochsenfleisch.



7. XII. 1923. Vor Ovariotomie (Schwangerschaft).

* Vor Fütterung. 1—6 Nach Fütterung.

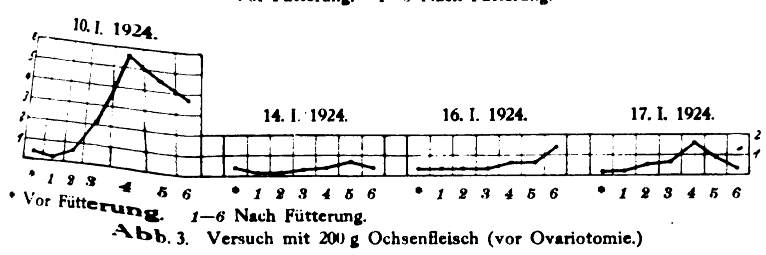


Abb. 3. Versuch mit 200 g Ochsenfleisch (vor Ovariotomie.)

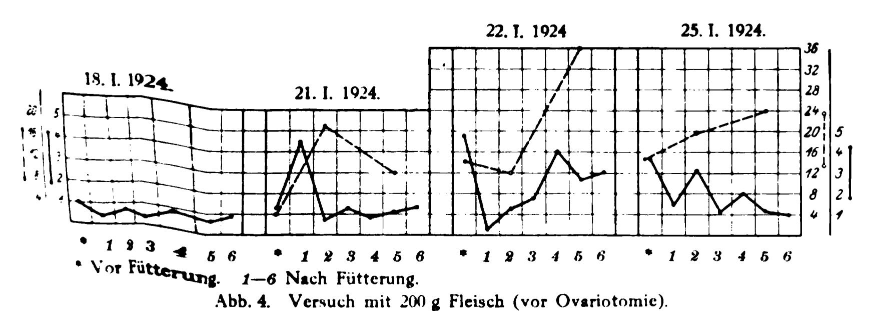
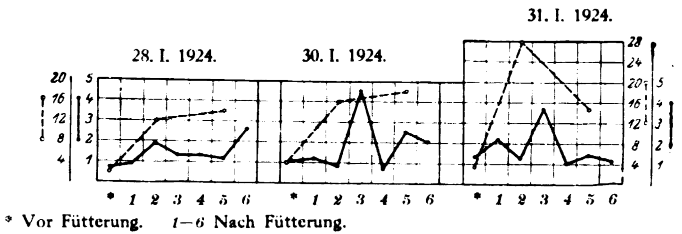
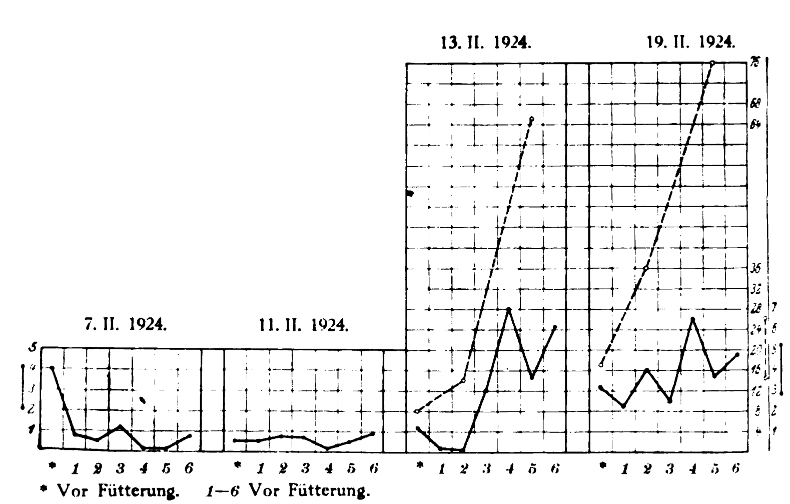


Abb. 4. Versuch mit 200 g Fleisch (vor Ovariotomie).



* Vor Fütterung. 1—6 Nach Fütterung.

Abb. 5. Versuch mit 200 g Fleisch (vor Ovariotomie).



* Vor Fütterung. 1—6 Vor Fütterung.

Abb. 6. Versuch mit 300 ccm Fettmilch (vor Ovariotomie).

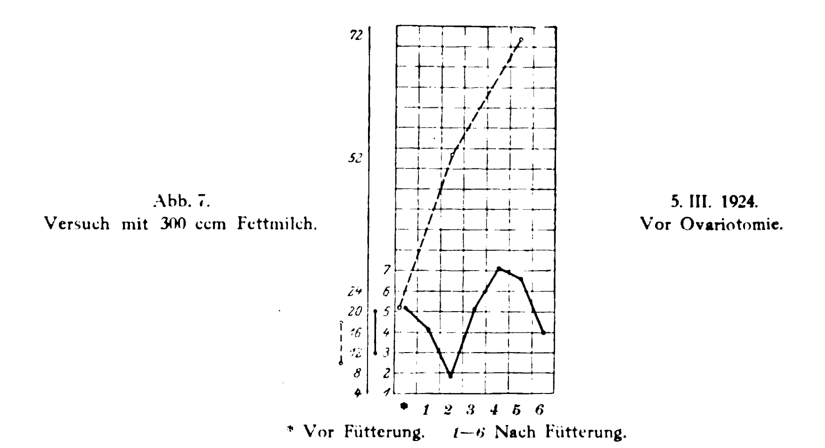
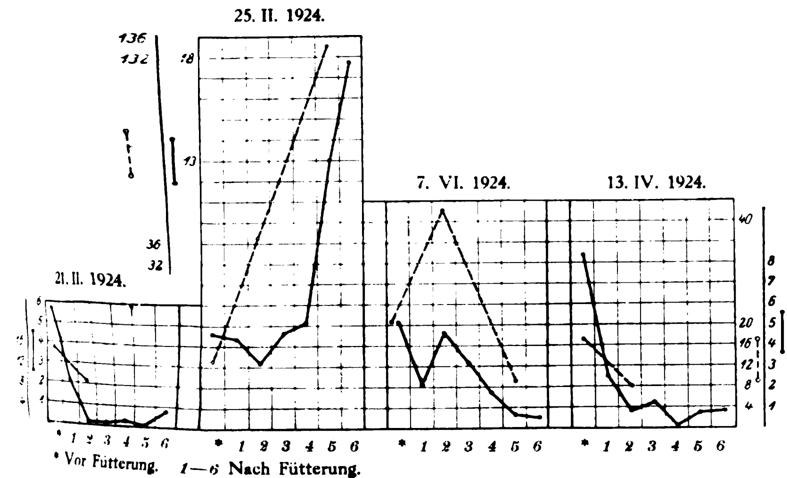


Abb. 7. Versuch mit 300 ccm Fettmilch.

5. III. 1924. Vor Ovariotomie.

* Vor Fütterung. 1—6 Nach Fütterung.



* Vor Fütterung. 1—6 Nach Fütterung.

Abb. 8. Versuch mit 300 g Brot (vor Ovariotomie).

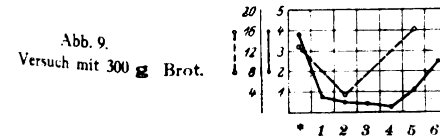
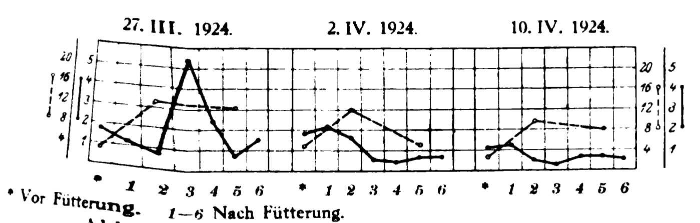


Abb. 9. Versuch mit 300 g Brot.

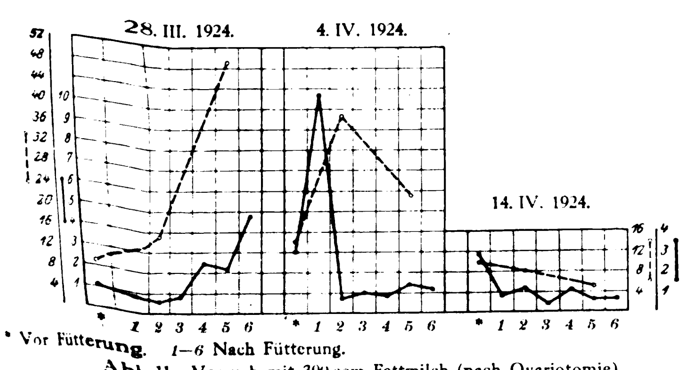
17. III. 1924. Vor Ovariotomie.

* Vor Fütterung. 1—6 Nach Fütterung.



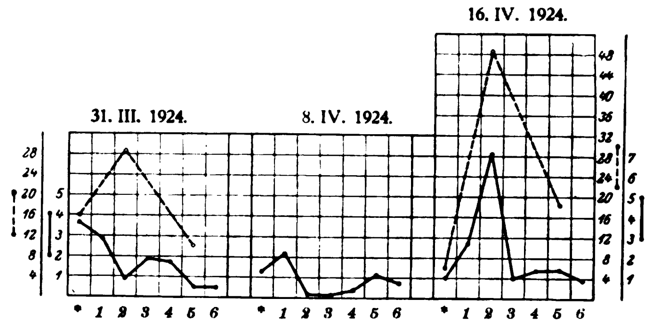
* Vor Fütterung. 1—6 Nach Fütterung.

Abb. 10. Versuch mit 200 g Ochsenfleisch (nach Ovariotomie).



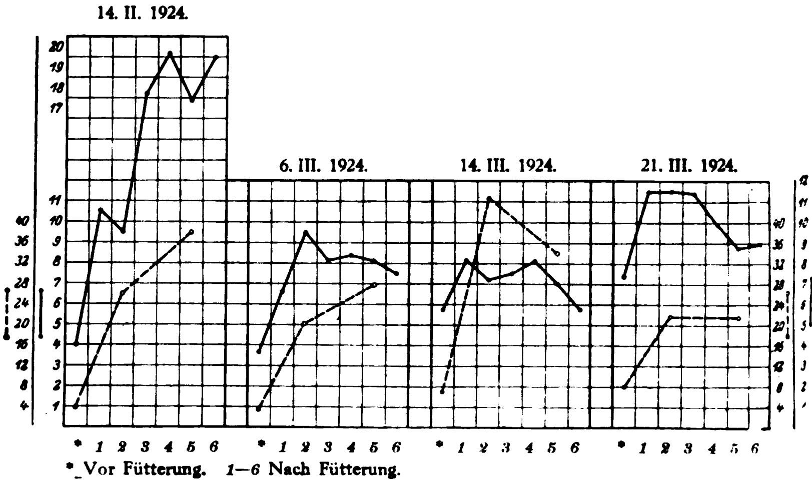
* Vor Fütterung. 1—6 Nach Fütterung.

Abb. 11. Versuch mit 300 ccm Fettmilch (nach Ovariotomie).



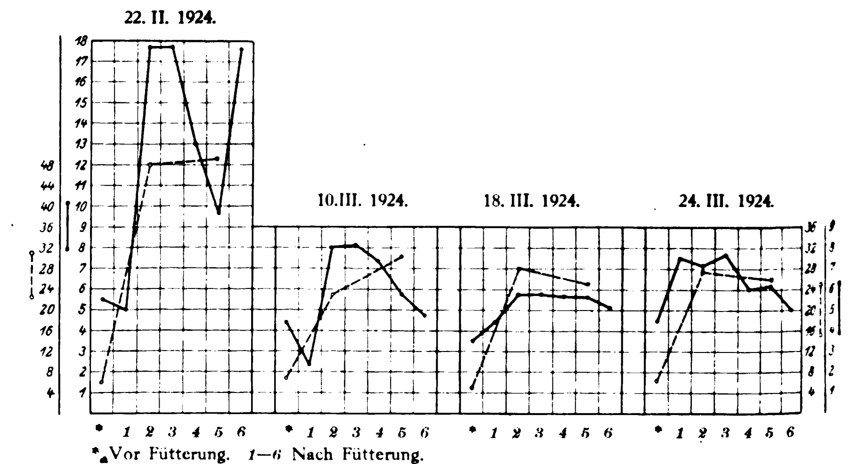
* Vor Fütterung. *1—6* Nach Fütterung.

Abb. 12. Versuch mit 300 g Brot (nach Ovariotomie).



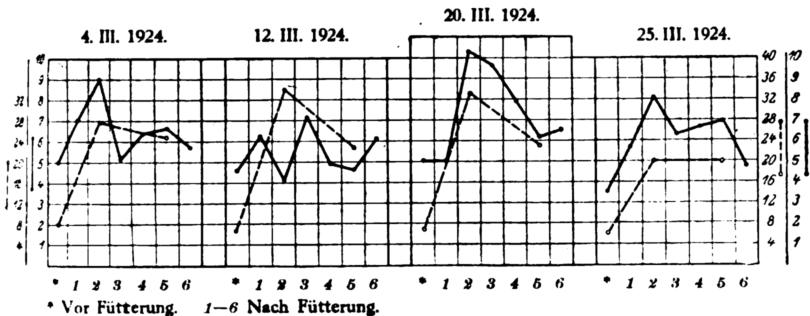
* Vor Fütterung. *1—6* Nach Fütterung.

Abb. 13. Versuch mit 200 g Ochsenfleisch (vor Ovariotomie).



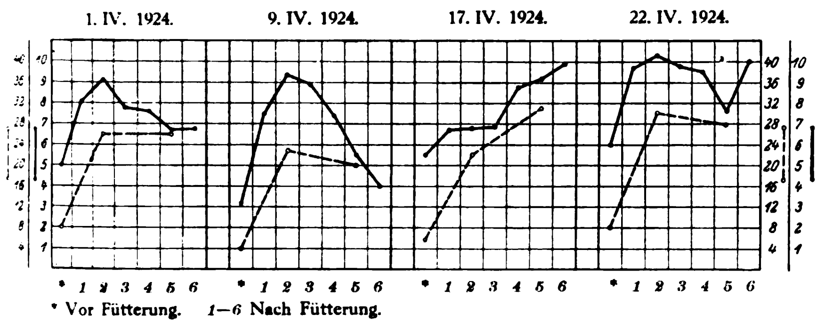
* Vor Fütterung. *1—6* Nach Fütterung.

Abb. 14. Versuch mit 300 ccm Fettmilch (vor Ovariotomie).



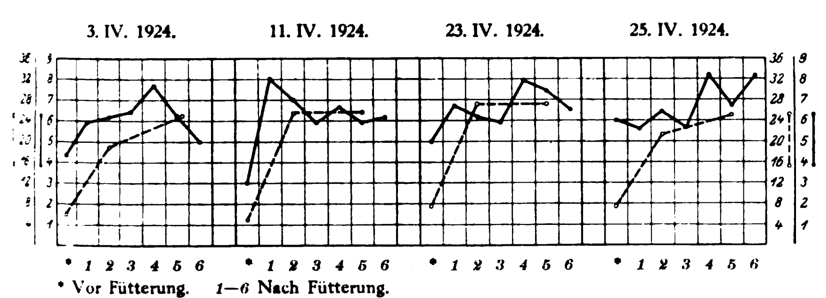
* Vor Fütterung. *1—6* Nach Fütterung.

Abb. 15. Versuch mit 300 g Brot.



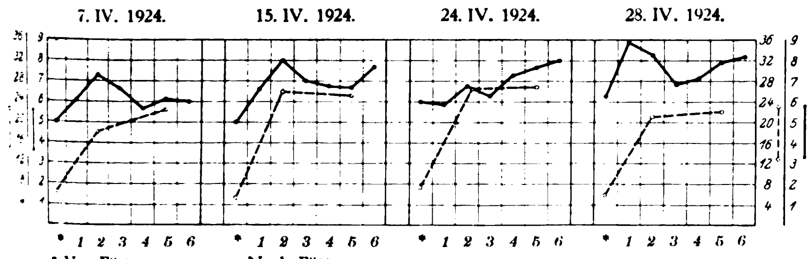
* Vor Fütterung. *1—6* Nach Fütterung.

Abb. 16. Versuch mit 200 g Ochsenfleisch (nach Ovariotomie).



* Vor Fütterung. *1—6* Nach Fütterung.

Abb. 17. Versuch mit 300 ccm Fettmilch (nach Ovariotomie).



* Vor Fütterung. *1—6* Nach Fütterung.

Abb. 18. Versuch mit 300 g Brot (nach Ovariotomie).

Über die Aktivität von proteolytischen und verwandten Enzymen einiger als Mycorrhizenpilze bekannten Hymenomyceten.

Von

Elias Melin und Karin Helleberg.

(Aus dem biochemischen Institut der Universität Stockholm.)

(Eingegangen am 27. Januar 1925.)

Aus den experimentellen Untersuchungen, die der erstgenannte von uns über die Mycorrhiza der Waldbäume ausgeführt hat, hat es sich ergeben, daß die Mycorrhizenpilze der Bäume bei dem Abbau der organischen Stickstoffverbindungen der Humusdecke eine große Rolle spielen. Letztere werden dabei zum Teil an die Bäume vermittelt[1]).

Es hat nun ein hohes Interesse zu erfahren, inwieweit verschiedene Mycorrhizenpilze die organischen Stickstoffverbindungen ungleich schnell abbauen. Wenn dies der Fall ist, hat man nämlich Grund zu vermuten, daß die in dieser Hinsicht aktivsten Pilzsymbionten auch für die Bäume die günstigsten sind, und zwar in bezug auf die Stickstoffnahrung.

Dies hat uns zu der vorliegenden Untersuchung veranlaßt. In erster Linie haben wir die Aktivität von proteolytischen Enzymen und Nuclease bei einigen bekannten Mycorrhizenpilzen untersucht. Außerdem wurden aber auch Urease und Desamidase studiert. Die genannten Enzyme sind alle in Reinkultuven von bisher untersuchten Mycorrhizenpilzen (*Boletus*arten, *Tricholoma flavobrunneum*, *M. R. silvestris β* und *γ*, *M. R. Abietis*) nachgewiesen worden.

Methode und Material.

Infolge ihres langsamen Wachstums in Reinkulturen ist es ziemlich schwer, eine für quantitativ enzymatische Untersuchungen genügende Menge von vegetativem Mycel der betreffenden Mycorrhizenpilze zu

[1]) *E. Melin*, Skogsvårdsfören. Tidskrift 1924, S. 197 (Vortrag).

erhalten. Es erscheint uns auch sehr fraglich, ob schwachwüchsige Kulturen dieselben enzymatischen Verhältnisse wie die Mycelien des Waldbodens aufweisen.

Um aber trotzdem irgend eine Auffassung von der Aktivität der genannten Enzyme von verschiedenen Arten zu bekommen, haben wir junge Fruchtkörper untersucht. *Zeller*[1]) hat eine enzymatische Studie von *Lenzites saepiaria* gemacht und dabei dargetan, daß die Enzyme des vegetativen Mycels im großen und ganzen mehr aktiv als die der Fruchtkörper sind. Selbst wenn dies auch bei den hier untersuchten Hymenomyceten der Fall ist, dürfte man aber annehmen können, daß das Verhältnis der verschiedenen Arten bezüglich der Enzymaktivität im großen und ganzen dasselbe in dem vegetativen Mycel wie in den Fruchtkörpern ist.

Folgende als Mycorrhizenpilze bekannte Hymenomyceten sind untersucht worden:

1. *Boletus luteus* L. Mycorrhizapilz an u. a. Kiefer[2]) und Lärche[3]).

2. *B. variegatus* Sw. Mycorrhizapilz an u. a. Kiefer[2]) und Lärche[3]).

3. *B. elegans* Schum. Mycorrhizapilz an Lärche[4]).

4. *Amanita muscaria* Fr. Mycorrhizapilz an u. a. Birke[5]), Lärche[3]), Kiefer und Fichte[6]).

5. *Lactarius deliciosus* L. Mycorrhizapilz an u. a. Kiefer und Fichte[6]).

6. *Russula rubra* Fr. Wahrscheinlich Mycorrhizapilz an u. a. Kiefer und Fichte[7]).

Nachdem die Fruchtkörper eingesammelt waren, wurden sie sofort sorgfältig gereinigt und die Oberhaut des Hutes, meistens auch die Lamellen und Röhren der Hutunterseite, weggenommen. Sie wurden dann im Mörser mit etwas Toluol zerrieben. Die dabei erhaltene breiartige Masse wurde in Flaschen aufbewahrt.

Die Pilze sind alle im September 1924 gesammelt worden. Das Material stammt aus der Umgebung von Stockholm, ausgenommen *B. variegatus*, der in Ångermanland (Anundsjö) im nördlichen Schweden

---

[1]) *S. M. Zeller*, Ann. Miss. Bot. Gard. **3**, 439, 1916.

[2]) *E. Melin*, Mykol. Unters. u. Ber. **2**, 1924; Bot. Notiser 1924, S. 69.

[3]) *Derselbe*, Svensk Bot. Tidskrift **19**, 1925.

[4]) *Derselbe*, ebendaselbst **16**, 161, 1922.

[5]) *Derselbe*, ebendaselbst **17**, 479, 1923.

[6]) *Derselbe*, Manuskript.

[7]) Die Art kommt in Kiefern- und Fichtenwäldern vor; vgl. *E. Melin*, Svensk Bot. Tidskrift **17**, 510, 1923.

gesammelt wurde. Die Untersuchung haben wir in den Monaten Oktober und November desselben Jahres ausgeführt.

Durch den Toluolzusatz werden die Hyphenzellen abgetötet, und eine genügende Menge Flüssigkeit diffundiert aus letzteren heraus. Diese Flüssigkeit wurde im Büchnertrichter abgesaugt und dann direkt für die Untersuchung gebraucht. Da der Wassergehalt der Fruchtkörper verschiedener Arten nicht erheblich schwankt, sind die auf diese Weise erhaltenen Enzymdispersionen miteinander vergleichbar. Für jeden Versuch haben wir 5 ccm Enzymdispersion genommen.

Die Versuche dauerten alle über 7 Tage und wurden bei Zimmertemperatur (etwa 18^0 C), und zwar jeder Versuch doppelt ausgeführt.

Die früher untersuchten Mycorrhizenpilze erreichen in Reinkulturen ihre optimale Entwicklung bei p_H 5 oder etwas darunter[1]). Da die betreffenden Pilze auch in der Natur bei dieser Wasserstoffionenkonzentration am besten zu gedeihen scheinen, haben wir in den Versuchen ein bestimmtes p_H, und zwar p_H 4,5, gehalten. Als Puffer hat eine 5proz. Phosphatlösung gedient.

Proteolytische Enzyme.

Es sind proteolytische Enzyme bei ziemlich vielen Hymenomyceten nachgewiesen worden, und zwar nicht nur in Reinkulturen, sondern auch in Auszügen von Fruchtkörpern. Sowohl holzzerstörende[2]) und koprophile Arten als auch solche, die sich später als symbiophil erwiesen haben, sind dabei untersucht worden. Bezüglich letzterer haben *Bourquelot* und *Hérissey*[3]) im Jahre 1898 die Aktivität von proteolytischen Enzymen aus Fruchtkörpern von *Amanita muscaria* untersucht. Es stellte sich heraus, daß der Auszug des Pilzes nach 4 Tagen beinahe alles Casein von abgerahmter Milch gespalten hatte, wonach sich Tyrosin in der Lösung nachweisen ließ. *Delezenne* und *Mouton*[4]) machten mit 0,8proz. NaCl Auszüge getrockneter Fruchtkörper von u. a. *Amanita muscaria* und *A. citrina*. Sie fanden, daß erstere Peptone und ebenso Gelatine und Casein, dagegen aber nicht Fibrin abzubauen vermochten. Nach den Untersuchungen von *Vines*[5]) zu urteilen, wird aber auch letzteres gespalten (die Untersuchung

---

[1]) *E. Melin*, Bot. Notiser 1924, S. 38.
[2]) *S. M. Zeller*, l. c.
[3]) *E. Bourquelot* et *H. Hérissey*, C. r. Acad. Paris **127**, 666, 1898.
[4]) *C. Delezenne* et *H. Mouton*, ebendaselbst **136**, 167 und 633, 1903.
[5]) *S. H. Vines*, Ann. Bot. **17**, 237, 1903.

mit Preßsaft von *Psalliota campestris* ausgeführt). *Kikkoji*[1]) hat das Vorkommen von Protease in den Fruchtkörpern von *Cortinellus Edodes* festgestellt, der möglicherweise Mycorrhizapilz an der in Japan vorkommenden *Pinus densiflora* ist[2]). Das gefundene Enzym ist in neutralen oder schwach alkalischen, dagegen aber nicht in sauren Lösungen aktiv. Unter den Abbaustoffen waren Tryptophan, Leucin und Tyrosin zu finden.

Bei unseren Versuchen über proteolytische Enzyme haben wir als Substrat Hühnereiweiß in 5proz. Lösung (Volumprozent) benutzt. Trockengewicht 0,0117 g/ccm.

Das Alter der Enzymdispersionen der verschiedenen Arten schwankt zwischen 3 und 26 Tagen (vgl. Tabelle I). Zu 10 ccm Eiweißlösung und 10 ccm 5proz. Phosphatlösung ($p_H = 4{,}5$) wurden 5 ccm Enzymdispersion mit etwas Toluol gefügt. In den Kontrollversuchen wurde der Gehalt an Aminosäuren unmittelbar nach dem Zusatz der Enzymdispersion, in den übrigen nach 7 Tagen bestimmt.

Tabelle I.

Aktivität von proteolytischen Enzymen (7 Tage).

Versuch	Alter der Enzymdispersion	Menge NaOH *)			Gebildete Menge NH_2 in 5 ccm Substrat	Gesamtmenge NH_2 aus 10 ccm 5proz. Eiweißlösung
		Anfangs	Nach 7 Tagen	Differenz		
	Tage	ccm	ccm	ccm	mg	mg
Boletus luteus	11	3,87 ± 0,02	5,83 ± 0,03	1,96	3,00	15,00
„ *variegatus* . .	26	6,05 ± 0,03	7,09 ± 0,03	1,04	1,59	7,95
„ *elegans*	22	4,68 ± 0,02	6,25 ± 0,08	1,57	2,35	11,75
Amanita muscaria . .	3	6,19 ± 0,05	7,32 ± 0,06	1,13	1,23	6,15
Lactarius deliciosus . .	23	6,05 ± 0,03	6,80 ± 0,03	0,75	1,15	5,75
Russula rubra	15	6,06 ± 0,03	8,37 ± 0,07	2,31	3,53	17,65

*) Die Normalität der gebrauchten Lauge = 0,09557 n; 1 ccm davon entspricht 1,53 mg NH_2.

Die Bestimmungen der Aminosäuren sind nach der Methode von *Willstätter* und *Waldschmidt-Leitz* ausgeführt worden[3]). Zu 5 ccm Lösung wurde in großem Überschuß 96proz. Alkohol (15 ccm) zugesetzt, der dabei entstandene Niederschlag abfiltriert und gewaschen. Dann

[1]) *T. Kikkoji*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **51**, 201, 1907.

[2]) *S. Mimura*, Extr. fr. Bull. of Forest Exper. Station Meguro, Tokyo 1915, S. 115.

[3]) *R. Willstätter* und *E. Waldschmidt-Leitz*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **54**, 2988, 1921; *S. Lövgren*, Zeitschr. f. anal. Chem. **64**, 457, 1924.

wurde 1 ccm Thymolphthaleinlösung hinzugefügt und Titration mit Lauge bis zu kräftiger Blaufärbung ausgeführt.

Die Ergebnisse der Versuche werden in Tabelle I mitgeteilt. Es geht hervor, daß die Aktivität von proteolytischen Enzymen der Fruchtkörper bei verschiedenen Arten ziemlich verschieden ist. Sie ist bei *Russula rubra* und *Boletus luteus* am größten, bei *Amanita muscaria* und *Lactarius deliciosus* am kleinsten. Bei letzterer Art ist die Aktivität etwa dreifach niedriger als bei *Russula rubra*.

Nuclease.

Das Vorkommen von Nuclease ist — außer bei holzzerstörenden Hymenomyceten[1]) — in den Fruchtkörpern von dem oben erwähnten *Cortinellus Edodes* festgestellt worden[2]). *Kikkoji* erhielt aus 150 ccm einer $2^2/_3$proz. Lösung von nucleinsaurem Natrium, mit 25 ccm Preßsaft des Pilzes gemischt, im Laufe von 5 Tagen 28,7 mg Phosphorpentoxyd. Das Enzym soll nach *Kikkoji* in neutralen und schwach sauren Lösungen aktiv sein. Es werden freie Purinbasen und Phosphorsäure gebildet.

Als Substrat haben wir in unseren Versuchen eine 2proz. Lösung nucleinsauren Natriums gebraucht[3]). Das Alter der Enzymdispersion schwankt zwischen 17 und 39 Tagen (vgl. Tabelle II).

Tabelle II.
Aktivität von Nuclease (7 Tage).

Versuch	Alter der Enzymdispersion	Menge $Mg_2P_2O_7$		Differenz	Gebildete Menge P_2O_5 in 5 ccm Substrat	Gesamtmenge P_2O_5 aus 10 ccm 2proz. nucleinsauren Natriums
		Anfangs	Nach 7 Tagen			
	Tage	mg	mg	mg	mg	mg
Boletus luteus	24	78,8 ± 0,1	89,9 *)	11,1	7,08	35,4
„ *variegatus* . .	39	78,8 ± 0,1	89,8 *)	11,0	7,02	35,1
„ *elegans*	21	78,8 ± 0,1	84,6 ± 0,3	5,8	3,9	19,5
Amanita muscaria . .	17	78,8 ± 0,1	83,3 ± 0,3	4,5	2,93	14,65
Lactarius deliciosus . .	25	78,8 ± 0,1	87,1 ± 0,9	8,3	5,2	26,0
Russula rubra	17	78,8 ± 0,1	81,5 ± 0,7	2,7	1,7	8,5

*) Der eine von den zwei Versuchen vergiftet.

Zu 10 ccm nucleinsauren Natriums und 10 ccm 5proz. Phosphatlösung ($p_H = 4,5$) sind 5 ccm Enzymdispersion mit etwas Toluol gebracht worden. Unmittelbar nach dem Zusatz der Enzymdispersion

[1]) *S. M. Zeller*, l. c.
[2]) *T. Kikkoji*, l. c.
[3]) Die Nucleinsäure aus Hefe.

wurden in allen Versuchen 5 ccm Flüssigkeit herausgenommen und der Gehalt an Phosphorsäure festgestellt. Nach 7 Tagen wurde letzterer in den übrigen 20 ccm der Lösungen bestimmt. Die Phosphorsäurebestimmungen sind nach der Methode von *Schmitz* ausgeführt worden.

Es erhellt aus Tabelle II, daß auch Phytonucleinsäure von den verschiedenen Arten verschieden schnell gespalten wird. Das Enzym ist bei *Boletus luteus* und *B. variegatus* am aktivsten. Die kleinste Aktivität findet man bei *Russula rubra*, bei der sie vierfach niedriger als bei den genannten *Boletus*arten ist.

Wenn wir die Ergebnisse mit den von *Kikkoji* erhaltenen vergleichen, finden wir, daß sämtliche untersuchten Mycorrhizenpilze die Nucleinsäure intensiver als *Cortinellus Edodes* spalten.

In den eben genannten Versuchen mit Nucleinsäure haben wir auch untersucht, inwieweit die erzeugten Purinbasen desamidiert werden. In Reinkulturen von untersuchten Mycorrhizenpilzen ist nämlich Ammoniak nachzuweisen, wenn als Stickstoffquelle Nucleinsäure gebraucht wurde[1]. Der NH_3-Gehalt ist nach der Methode von *Folin*[2] bestimmt worden. Das Ammoniak wurde durch eine konzentrierte K_2CO_3-Lösung (40 bis 50 ccm) frei gemacht und durch einen mittels H_2SO_4 gewaschenen Luftstrom in eine Vorlage mit bestimmter Menge n/10 HCl übergeführt. Der Überschuß an Säure in der Vorlage wurde durch n/10 NaOH und Methylorange bestimmt.

Tabelle III.

Desamidation von Purinbasen in den Versuchen mit Nucleinsäure. (Durchschnittswerte von zwei Versuchen.)

Versuch	H_3N in 5 ccm Substrat mg	Gesamtmenge H_3N aus 10 ccm 2 proz. nucleinsaurem Natrium mg
Boletus luteus	0,58	2,90
„ *variegatus*	0,27	1,35
„ *elegans*	0,08	0,40
Amanita muscaria	0,44	2,20
Lactarius deliciosus	0,59	2,95
Russula rubra	0,92	4,60

Wie aus Tabelle III ersichtlich ist, werden die Purinbasen nur verhältnismäßig langsam desamidiert. Es dürfte wahrscheinlich sein, daß die Aktivität des betreffenden Enzyms in dem vegetativen Mycel

[1]) *E. Melin*, Svensk Bot. Tidskrift **18**, 462, 1924.
[2]) *S. Lövgren*, diese Zeitschr. **119**, 215, 1921.

größer als in den Fruchtkörpern ist, wie es der Fall mit Urease und Desamidase sein dürfte (vgl. unten).

Es hat sich weiter herausgestellt, daß die Aktivität des Purinbasenenzyms in keinem Verhältnis zu derselben von Nuclease steht. Sie ist nämlich am größten bei *Russula rubra*, bei welcher die Aktivität von Nuclease am niedrigsten ist, am kleinsten dagegen bei *Boletus elegans*, bei dem die Nuclease ziemlich aktiv ist. Es ist anzunehmen, daß dasselbe Verhältnis in dem vegetativen Mycel vorhanden ist.

Urease und Desamidase.

Bekanntlich kommen desamidierende Enzyme bei den niederen Pilzen sehr häufig vor. Bei den Hymenomyceten wurden sie aber weniger häufig beobachtet. *Kikkoji*[1]) stellte Urease bei dem oben erwähnten *Cortinellus Edodes* fest. Nach *Goris* und *Costy*[2]) soll letzteres Enzym bei den meisten Basidiomyceten — nicht aber bei den Gattungen *Amanita* und *Lepiota* — vorkommen. Unter den holzzerstörenden Hymenomyceten hat *Zeller*[3]) Urease als das einzige desamidierende Enzym bei *Lenzites saepiaria* nachgewiesen. Es kommt sowohl in den Fruchtkörpern als in dem vegetativen Mycel vor, auch wenn es in letzterem aktiver als in ersteren ist.

Wir haben nun die Enzymdispersionen[4]) der Mycorrhizenpilze auf 2proz. Lösungen von Harnstoff und Asparagin geprüft, und zwar nach dem folgenden Plane:

1. 10 ccm Harnstofflösung + 10 ccm 5proz. Phosphatlösung ($p_H = 4.5$) + 5 ccm Enzymdispersion + Toluol.
2. 10 ccm Harnstofflösung + 10 ccm 5proz. Phosphatlösung ($p_H = 4.5$) + 5 ccm H_2O + Toluol (Kontrolle).
3. 10 ccm Asparaginlösung + 10 ccm 5proz. Phosphatlösung ($p_H = 4.5$) + 5 ccm Enzymdispersion + Toluol.
4. 10 ccm Asparaginlösung + 10 ccm 5proz. Phosphatlösung ($p_H = 4.5$) + 5 ccm H_2O + Toluol (Kontrolle).

Nach 7 Tagen wurde der NH_3-Gehalt bestimmt, und zwar nach der Methode von *Folin* (vgl. oben).

Wir finden in Tabellen IV und V, daß die Aktivität von sowohl Urease als Desamidase in sämtlichen Versuchen ziemlich niedrig gewesen ist. Am größten ist sie bei *Russula rubra*, am kleinsten bei *Boletus elegans* gewesen, und zwar bei ersterer etwa dreifach größer

---

[1]) *T. Kikkoji*, l. c.
[2]) *A. Goris* und *P. Costy*, C. r. Acad. Paris **175**, 539, 1922.
[3]) *S. M. Zeller*, l. c., S. 489.
[4]) Die Enzymdispersionen selbst enthielten kein Ammoniak.

als bei letzterem. Die Reihenfolge bezüglich der Aktivität von Urease und Desamidase ist sonst nicht ganz dieselbe für die verschiedenen Arten. Sie ist für Urease die folgende:

1. *Russula rubra*,
2. *Boletus luteus*,
3. *Lactarius deliciosus*,
4. *B. variegatus* und *Amanita muscaria*,
5. *B. elegans*,

und für Desamidase wie folgt:

1. *Russula rubra*,
2. *Lactarius deliciosus*,
3. *Amanita muscaria*,
4. *Boletus variegatus*,
5. *B. luteus*,
6. *B. elegans*.

Tabelle IV.

Aktivität von Urease (7 Tage).

Versuch	Alter der Enzym-dispersion Tage	Menge NaOH *) ccm	Gebildete Menge NH_3 in 10 ccm Substrat mg	Gesamtmenge NH_3 aus 10 ccm 2proz. Harnstoff-lösung mg
Boletus luteus	34	8,79 ± 0,31	0,99	2,48
„ *variegatus* . . .	49	9,09 ± 0,0	0,50	1,25
„ *elegans*	33	9,15 ± 0,03	0,41	1,03
Amanita muscaria . .	26	9,09 ± 0,01	0,50	1,25
Lactarius deliciosus . .	34	9,03 ± 0,02	0,62	1,55
Russula rubra	26	8,57 ± 0,05	1,34	3,35
Kontr. ohne Enzym-dispersion	—		0,0	0,0

*) Die Normalität der Säure: 10 ccm HCl = 9,40 ± 0,05 NaOH.

Tabelle V.

Aktivität von Desamidase (7 Tage).

Versuch	Alter der Enzym-dispersion Tage	Menge NaOH *) ccm	Gebildete Menge NH_3 in 10 ccm Substrat mg	Gesamtmenge NH_3 aus 10 ccm 2proz. Asparagin-lösung mg
Boletus luteus	60	4,79 ± 0,03	0,28	0,70
„ *variegatus* . . .	75	4,77 ± 0,03	0,31	0,78
„ *elegans*	59	4,80 ± 0,01	0,26	0,65
Amanita muscaria . .	52	4,70 ± 0,09	0,42	1,05
Lactarius deliciosus . .	60	4,64 ± 0,04	0,52	1,30
Russula rubra	52	4,50 ± 0,03	0,75	1,88
Kontr. ohne Enzym-dispersion	—		0	0

*) Die Normalität der Säure: 5 ccm HCl = 4,96 ± 0,01 ccm NaOH.

Die Reihenfolge der Aktivität von Urease ist somit im großen und ganzen dieselbe wie die von dem Purinbasenenzym.

Es sei hervorgehoben, daß die Enzymdispersionen selbst kein Ammoniak enthielten.

Ob es dasselbe Enzym ist, das Harnstoff und Asparagin desamidiert, läßt sich durch unsere Untersuchungen nicht sicher entscheiden. Zwar spricht die eben erwähnte verschiedene Reihenfolge der Enzymaktivität dafür, daß dies nicht der Fall ist, wir haben aber keine Versuche gemacht, um diese Frage näher zu studieren.

Die geringe Aktivität von Urease und Desamidase in den Versuchen dürfte zum Teil von der Natur der Enzymdispersionen abhängen. Es ist von verschiedenen Forschern die überaus große Empfindlichkeit des Harnstoffenzyms hervorgehoben worden. So soll dieses durch Toluol sehr schnell inaktiviert werden[1]). Die Enzymdispersionen der Ureaseversuche waren 26 bis 49 und die der Desamidaseversuche 52 bis 75 Tage mit Toluol aufbewahrt worden.

Außerdem ist es sehr wahrscheinlich, daß Urease und Desamidase der Fruchtkörper im Vergleich mit denselben des vegetativen Mycels ziemlich wenig aktiv sind, ganz wie es der Fall mit Urease bei *Lenzites saepiaria* ist[2]).

Zusammenfassung.

1. Die Untersuchung hat ergeben, daß proteolytische Enzyme und Nuclease in den jungen Fruchtkörpern von verschiedenen Arten ziemlich ungleich aktiv sind. Bei *Russula rubra* ist die Aktivität der ersteren hoch, die der letzteren aber verhältnismäßig niedrig, während bei *B. variegatus* und *Lactarius deliciosus* der Fall gerade umgekehrt ist. Bei *B. luteus* sind beide Enzymgruppen sehr aktiv, *B. elegans* nimmt eine Zwischenstellung ein und bei *Amanita muscaria* finden wir in beiden Fällen eine verhältnismäßig geringe Aktivität. Wenn die höchste gefundene Aktivität mit 100 bezeichnet wird, erhalten wir für proteolytische Enzyme und Nuclease folgende Werte:

	Proteolytische Enzyme	Nuclease		Proteolytische Enzyme	Nuclease
Boletus luteus . . .	85	100	*Amanita muscaria* .	35	41
„ *variegatus* .	45	99	*Lactarius deliciosus*.	33	73
„ *elegans* . .	67	55	*Russala rubra* . . .	100	24

2. Auch die Aktivität von desamidierenden Enzymen ist bei verschiedenen Arten sehr verschieden.

---

[1]) *W. Kruse*, Allgem. Mikrobiologie, S. 598. Leipzig 1910.
[2]) *S. M. Zeller*, l. c., S. 489.

3. Gehen wir davon aus, daß bezüglich der Enzymaktivität das entsprechende Verhältnis der untersuchten Arten in dem vegetativen Mycel wie in den Fruchtkörpern vorhanden ist, so könnte man daraus schließen, daß die verschiedenen Mycorrhizenpilze in der Natur bis zu einem gewissen Grade an verschiedene organische Stickstoffverbindungen oder Gruppen von solchen angepaßt sind. Nach dieser Folgerung können einige Arten die komplizierten Eiweißkörper der Humusschicht besser als deren Abbauprodukte ausnutzen; andere verwerten letztere besser als erstere, wiederum andere die Proteinstoffe ebenso leicht wie deren Abbauprodukte. Die Bäume könnten somit durch verschiedene Pilzsymbionten verschiedene organische Stickstoffverbindungen des Bodens ungleich leicht ausnutzen.

Untersuchungen zur Lehre von der Blutgerinnung.

XIII. Mitteilung:

Über das Serum-Metathrombin.

Von

Bernhard Stuber, Fritz Focke und **Chien Shen.**

(Aus dem Laboratorium der medizinischen Klinik zu Freiburg i. B.)

(Eingegangen am 27. Januar 1925.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Frische Thrombinlösungen verlieren meist nach kürzerer Zeit ihre Wirksamkeit.

Sie können aber wieder reaktiviert werden. Nach *Alexander Schmidt*[1]) verfährt man dabei am besten so, daß man auf die unwirksame Thrombinlösung dieselbe Menge n/10 Natronlauge etwa ½ Stunde einwirken läßt. danach wird mit n/10 Schwefelsäure neutralisiert. Solche reaktivierten Thrombinlösungen sind gewöhnlich äußerst kräftig wirksam. Nach *Morawitz*[2]) gelingt die Reaktivierung auch, wenn man umgekehrt vorgeht. zuerst Säure zufügt und nachträglich mit Lauge neutralisiert. Die Wirkung ist aber schlechter als nach dem Verfahren von *Alexander Schmidt*. Das können wir bestätigen. Nach den Untersuchungen von *Morawitz*[3]) und *Fuld*[4]) sind zwei unwirksame Modifikationen des Fibrinferments zu unterscheiden. Die eine, die durch Kalksalze aktivierbar ist, findet sich im Oxalatplasma (α-Prothrombin von *Morawitz*, Prothrombin von *Pekelharing*), die andere kommt in größerer Menge im Blutserum vor (β-Prothrombin von *Morawitz*, Metazym von *Fuld*). Letztere inaktive Thrombinmodifikation wird nicht durch Kalksalze, wohl aber durch Laugen und Säuren reaktiviert. Nach den Anschauungen von *Fuld* und *Morawitz* handelt es sich nun bei dem letztgenannten inaktiven. durch Lauge bzw. Säure reaktivierbaren Thrombin um kein Proferment. Es sollte vielmehr

[1]) Zur Blutlehre. Leipzig 1892.
[2]) Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **4**, 1904.
[3]) l. c.
[4]) Centralbl. f. Physiol. **17**, 1903; Hofmeisters Beitr. **5**, 1904 (mit *Spiro*).

der größte Teil des bei der Gerinnung des Blutes sich bildenden Thrombins rasch in einen stabileren, aber nun unwirksamen Zustand übergeführt werden. Aus dieser inaktiven Form (jetzt Metazym oder Metathrombin genannt) ist das Thrombin durch Alkali bzw. Säure wieder reaktivierbar. Über den Mechanismus der Umwandlung des Thrombins in das unwirksame Metathrombin besteht jedoch noch keine Klarheit. Während *Pekelharing*[1]) vermutet, daß beim Altern der Thrombinlösung gerinnungshemmende Substanzen entstehen, die die Thrombinwirkung aufheben, führen *Landsberg*[2]) und *Mellanby*[3]) die Umwandlung auf eine Adsorption des Thrombins zurück. Nach *Landsberg* ist die Aktivierung des inaktiven Serums nichts anderes als „eine Sprengung der Adsorptionsbindung des Thrombins“. Während von früheren Autoren auf die Labilität des Thrombins hingewiesen wurde, es sollte schon nach wenigen Stunden irreversibel zerstört sein, konnte in neuester Zeit durch *Hiruma*[4]) gezeigt werden, daß diese Ansicht nicht zu Recht besteht. Unter den geeigneten Bedingungen behalten Thrombinlösungen *wochenlang* ihre gerinnungsauslösenden Eigenschaften.

Zweck dieser Untersuchungen war nun, festzustellen, ob neben der bekannten Lauge-Säurereaktivierung inaktiver Sera noch mit anderen Methoden dasselbe Ziel erreicht werden kann. Sollte dies der Fall sein, so wäre denkbar, auf Grund der verschiedenen Reaktivierungsmethoden einen näheren Einblick in die Vorgänge beim Altern der Thrombinlösungen zu gewinnen.

Als Thrombinlösung benutzten wir Pferdeserum, als Gerinnungsreagens Fibrinogenlösungen aus Pferdeblut, nach *Hammarsten* dargestellt. In allen Versuchen wurde 1 ccm Fibrinogen mit 1 ccm Serum gemischt. Die Fibrinogenlösungen wurden vor dem Versuch auf Stabilität wie früher geprüft.

Zunächst fiel uns die *verschiedene Wirkungsdauer* der einzelnen Sera auf. Die Angaben *Hirumas* können wir bestätigen. Die Sera wurden im Eisschrank aufbewahrt, teilweise über Toluol bzw. Paraffin. Die von *Hiruma* betonte günstige Beeinflussung des Toluolzusatzes trat in unseren Versuchen nicht deutlich in Erscheinung. Es dürfte dies jedoch darauf zurückzuführen sein, daß wir in unseren Versuchen nicht das quantitative Reihenverfahren *Wohlgemuths* durchführten, das schon geringe Wirkungsdifferenzen aufdeckt. Für unsere Fragestellung war es völlig genügend zu entscheiden, ob ein Serum überhaupt noch gerinnungsauslösende Eigenschaften besitzt. Worauf diese zeitlich verschiedenartige Wirkung der einzelnen Sera, trotzdem daß dieselben unter durchaus gleichen Bedingungen gehalten wurden, beruht, vermögen wir nicht zu entscheiden. Die Kurven der Abbildungen 1 bis 4

---

[1]) Diese Zeitschr. **11**, 1908.
[2]) Ebendaselbst **50**, 1913.
[3]) Journ. of Physiol. **38**, 1908.
[4]) Diese Zeitschr. **139**, 1923.

orientieren über die mannigfachen zeitlichen Schwankungen in der Wirkungsdauer der einzelnen Seren.

Jedenfalls muß *Hiruma* zugestimmt werden, daß von einer *besonderen Labilität des gerinnungserzeugenden Agens des Serums keine Rede sein kann.* So ist in Abb. 3 die Wirkungskurve eines Serums angegeben, das 65 Tage lang seine ursprüngliche Wirkung beinahe konstant behielt und erst vom 75. Tage an unwirksam wurde. Wir

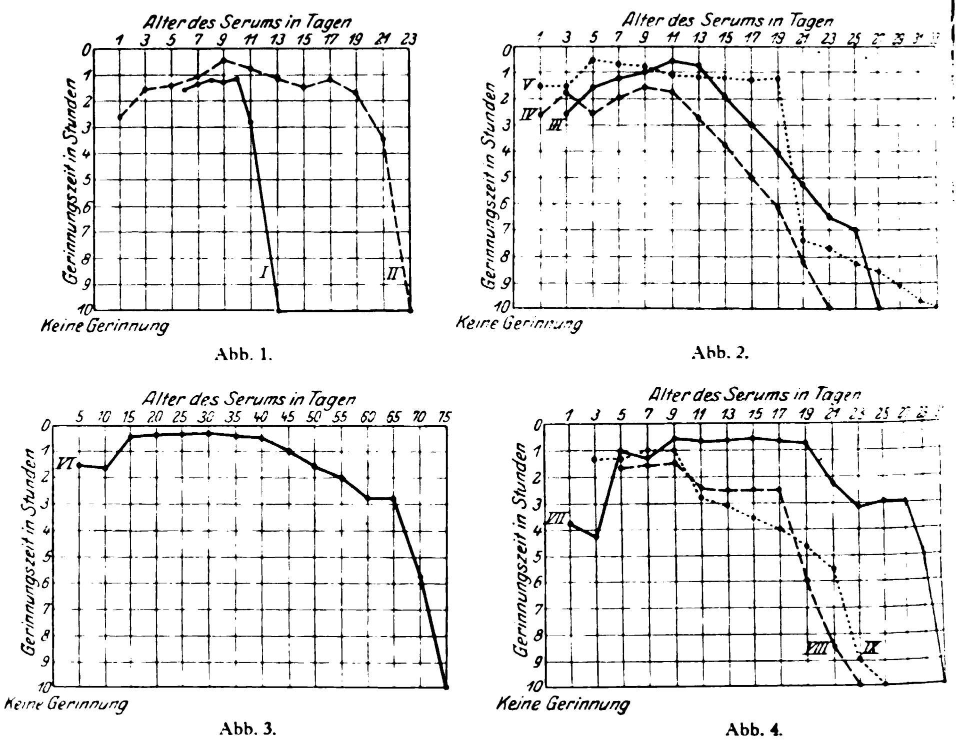


Abb. 1. Abb. 2. Abb. 3. Abb. 4.

hatten sogar einzelne Sera, deren Wirksamkeit sich auf *3 bis 4 Monate erstreckte.* Bestimmte Beziehungen der H^+-Ionenkonzentrationen der Sera zu ihrer Wirkungsweise etwa derart, daß sich mit abnehmender Serumwirkung regelmäßig auch typische Änderungen der H^+-Ionenkonzentrationen feststellen ließen, konnten wir nicht finden. Es zeigt sich vielmehr *keine Parallelität* zwischen H^+-Ionenkonzentration und Serumwirkung. Einzelne Sera erhalten sogar bis in das unwirksame Stadium hinein die H^+-Ionenkonzentration auffallend konstant. Die Veränderungen, die die Unwirksamkeit des Serums herbeiführen, drücken sich also *keineswegs* in einer konstanten Verschiebung der H^+-Ionenkonzentration aus. Wir verweisen diesbezüglich auf die Tabelle I.

Tabelle I.

Serum	p_H	Gerinnungsauslösende Eigenschaften
A	7,4	+
B	7,5	—
C	7,3	—
D	7,7	+
E	7,2	+
F	7,1	++
G	7,6	+++

Bei einzelnen Sera machten wir die Beobachtung, daß die gerinnungsauslösende Wirkung beim Stehen in den nächsten Tagen zunimmt, dabei zeigte sich eine Abnahme der H^+-Ionenkonzentration mit Steigerung der Wirkung, dann von $[H]^+ = 10^{-8,4}$ an plötzlich rascher Wirkungsabfall mit ebenso raschem Vorrücken der Reaktion nach der alkalischen Seite. Abb. 5 gibt diese Wirkungsweise wieder.

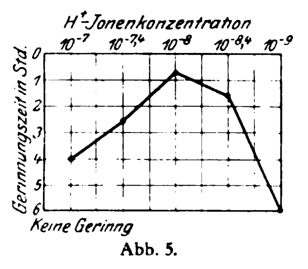


Abb. 5.

Da diese Erscheinungen jedoch keineswegs regelmäßig beobachtet werden konnten, so dürften Änderung in der H^+-Ionenkonzentration der alternden Sera nicht das Wesentliche für die Verschiedenheiten ihrer gerinnungsauslösenden Wirkungen sein.

Wir prüften nun die unwirksam gewordenen Sera auf ihre Reaktivierungsfähigkeit zunächst nach der bekannten Methode, indem die Sera mit der gleichen Menge n/10 Natronlauge versetzt wurden. Nach 1/4 bis 1/2 Stunde wurde dann die Lauge mit der gleichen Menge n/10 Schwefelsäure neutralisiert. Meist bringen derartig reaktivierte Sera Fibrinogen rascher zur Gerinnung als die entsprechenden frischen Sera. Wir verweisen diesbezüglich auf die tabellarische Zusammenstellung aus unseren Versuchen (Tabellen II und III). Dabei konnte zunächst festgestellt werden, daß die *Dauer* der Einwirkung der Natronlauge auf das inaktive Serum von *keiner* Bedeutung ist. Auch wenn wir die zugesetzte Natronlauge *sofort* neutralisierten, trat regelmäßig Reaktivierung ein. Besonders auffallend war uns aber der Nachweis, daß öfters eine Reaktivierung auch dann gelingt, wenn man die entsprechende Menge Natronlauge zuerst mit Schwefelsäure neutralisiert und dann rasch das Gemisch zum Serum zufügt. Jedoch gelingt dies nicht mit jedem Serum, es scheint dafür ein bestimmter Grad der Zersetzung nötig. Das Wegfallen eines zeitlichen Faktors der Natronlaugeeinwirkung scheint uns deshalb bemerkenswert, weil die Ansicht geäußert wurde, die Natronlauge bewirke eine Lösung der Thrombinadsorption an die Serumeiweißkörper und dadurch das erneute Aktiv-

werden solcher Lösungen. Diese Ansicht dürfte nach obigem Befunde jedenfalls nicht für alle inaktiven Sera zutreffen.

Tabelle II.

Art der Reaktivierung	Gerinnungszeiten				
	Serum I	Serum II	Serum III	Serum IV	Serum V
n/10 Natronlauge + $^{1}/_{10}$ Schwefelsäure	38′	nicht reaktivierbar	47′	2h	18′
Chloroform	26′	"	30′	40′	15′
Kaolin	6h	"	6h	4h	4h
Talkum	6h	"	6h	4h	4h
Kieselgur	6h	"	6h	4h	4h
Tierkohle	6h	"	6h	5h	4h
Durch Dialyse	—	nach 4h	6h	2h 50′	2h 34′
Durch Thrombindarstellung nach *Alex. Schmidt* mittels Alkoholfällung	40′	58′	1h 10′	4h	2h

Das Fibrinogen hatte 4prom. Albumin und 1,3proz. NaCl-Gehalt.

Im weiteren Verfolg unserer Untersuchungen konnten wir fernerhin den Nachweis erbringen, daß die verschiedensten Methoden die Reaktivierung inaktiven Serums bewirken. Wir schüttelten inaktives Serum mit Chloroform aus. Nach Absetzen im Scheidetrichter wurde das Chloroform abgelassen. Das ausgeschüttelte Serum über Paraffin so lange evakuiert, bis kein Chloroform mehr nachweisbar war. Ein derartig mit Chloroform ausgeschütteltes Serum wirkt nun wieder sehr intensiv, es wirkt sogar meist stärker, als dasselbe mit Natronlauge-Schwefelsäure reaktivierte Serum. Der Gedanke, daß das Chloroform dem inaktiven Serum hemmende Substanzen entziehe, war naheliegend. Dementsprechend wurden die Chloroformauszüge im Vakuum getrocknet, dann die Rückstände in physiologischer Kochsalzlösung emulgiert. Diese Emulsionen wurden nun einer Thrombinlösung in steigenden Mengen zugesetzt und geprüft, ob dadurch eine Verzögerung der Thrombin-Fibrinogengerinnung eintritt. Das war jedoch niemals der Fall. Die Wirkung des Chloroforms muß also in anderer Richtung liegen.

Weiterhin konnten wir noch feststellen, daß die Ausschüttelung inaktiver Sera mit Kaolin, Talkum, Kieselgur und Tierkohle vielfach dieselben wieder wirksam macht. Die Präparate wurden vor dem Gebrauch kalk- bzw. säurefrei gewaschen. Nach beendeter Ausschüttelung wurde das Adsorbens durch scharfes Zentrifugieren entfernt. Der zeitliche Effekt ist bei den verschiedenen Adsorbenzien kein gleichartiger. Kieselgur wirkt oft da noch, wo die anderen Adsorbenzien versagen. Wir verwendeten durchschnittlich 1 bis 2 g Adsorbens auf 10 ccm Serum. Jedoch lassen sich diesbezüglich keine bestimmte Regeln aufstellen. Bei dem ungleichmäßigen Verlauf der Zersetzungs-

prozesse in den einzelnen Seren (Abb. 1 bis 4) ist das verständlich. Es muß das quantitative Optimum für jedes einzelne Serum erst durch Vorversuch festgestellt werden. Auch die Dauer des Ausschüttelns ist von Einfluß. Am häufigsten erreichten wir die besten Resultate bei kurzer Schüttelung von 1 bis 10 Minuten. Einigemal mußte für Erreichung der optimalen Wirkung eine halbe Stunde geschüttelt werden. Worauf diese Verschiedenheiten in der Erzielung des Effekts beruhen, vermögen wir zurzeit nicht zu entscheiden. Zu langes Schütteln stört die Reaktivierung, wohl dadurch, daß dabei auch größere Mengen der Serumeiweißkörper zum Verlust kommen. Wir möchten noch bemerken, daß irgend ein Zusammenhang zwischen inaktivem Serum bzw. reaktiviertem Serum einerseits und proteolytischer Tätigkeit im Sinne *Stephans* nicht festgestellt werden konnte. Wir konnten nur bei den durch Chloroform reaktivierten Seren eine eben nachweisbare Eiweißverdauung (Methode *Müller-Jochmann*) feststellen. Während alle anderen reaktivierten Seren ein negatives Ergebnis lieferten.

Diese von uns festgestellte Tatsache der *Reaktivierung* inaktiver Sera durch *Ausschütteln mit Adsorbenzien* erscheint uns deshalb bemerkenswert, da diese Methoden sonst gerade in entgegengesetzter Richtung, zur *Inaktivierung* aktiver Fermentlösungen, Verwendung finden. Daß durch ein derartiges Ausschüttelungsverfahren die hypothetische Thrombin-Eiweißadsorption etwa gesprengt werde, erscheint uns physikalisch schwer erklärbar. Viel mehr Wahrscheinlichkeit dürfte die Anschauung haben, daß die Adsorbenzien gerinnungshemmende Stoffe, die in den alternden Seren autolytisch, eventuell auch bakteriell sich bilden, entfernen. In dieser Ansicht bestärkten uns weitere Versuche. Es ließ sich nämlich zeigen, daß durch *Dialyse* ebenfalls eine Reaktivierung inaktiver Sera möglich ist. Die Dialyse wurde in salzfrei gewaschenen Pergamenthülsen (*Schleicher* und *Schüll*) gegen destilliertes Wasser vorgenommen. Die Dauer der Dialyse, um wirksame Sera zu erhalten, ist für die einzelnen Sera verschieden lang, immer mehrere Tage bei häufigem Wasserwechsel. Es müssen also tatsächlich durch die Dialyse hemmende Substanzen entfernt werden. Das konnten wir auch dadurch beweisen, daß die Außenflüssigkeit, auf wenige Kubikzentimeter im Vakuum eingeengt, eine deutliche Hemmung auf die Thrombin-Fibrinogengerinnung in der oben angegebenen Durchführung zeigte.

Außerdem konnte nun noch in weiteren Untersuchungen eine unseres Erachtens besonders bemerkenswerte Tatsache festgestellt werden. Aus allen inaktiven Seren läßt sich durch Fällen mit *Alkohol* nach *Alexander Schmidt voll wirksames Thrombin* darstellen, und zwar, und das scheint uns besonders wichtig, auch aus *völlig zersetzten Seren*, bei denen eine Reaktivierung mit keiner Methode mehr möglich ist.

Wir sehen darin eine weitere Stütze für unsere schon früher geäußerte Ansicht, daß die gerinnungsauslösende Wirkung des Serums und des Thrombins von *Alexander Schmidt* miteinander nicht identisch sind. Daß also aus dem gleichen Endeffekt nicht auch auf dasselbe wirksame Agens geschlossen werden darf. Nachdem die Chloroformausschüttelung und Alkoholfällung inaktiver Sera zu günstigen Resultaten führte, haben wir weiterhin noch die Ausschüttelung mit Äther und Schwefelkohlenstoff und die Fällung mit Aceton versucht, auch mit diesen Methoden gelangten wir zu positiven Ergebnissen.

Wie aus Tabelle III zu ersehen ist, sind, wie bei der früher erwähnten Ausschüttelung mit Adsorbenzien, nicht alle inaktiven Sera mit sämtlichen Methoden reaktivierbar. Auch dafür dürfte die verschiedene Art bzw. Schnelligkeit der Zersetzung der einzelnen Sera maßgebend sein. Im allgemeinen ließen sich alle die Sera, die mit der üblichen Natronlauge-Schwefelsäuremethode gut reaktivierbar waren, auch mit den übrigen Methoden wieder wirksam machen. Versagte

Tabelle III.

Nr.	Reaktivierung mit	Gerinnungszeiten			
		Inaktives Serum VI	Inaktives Serum VII	Inaktives Serum VIII	Inaktives Serum IX
1	n/10 NaOH aa 30 Min. + n/10 H_2SO_4			+ 10 Stdn.	
2	n/10 NaOH „ 20 „ + n/10 H_2SO_4			+ 10 „	
3	n/10 NaOH „ 10 „ + n/10 H_2SO_4			+ 10 „	
4	n/10 NaOH „ 5 „ + n/10 H_2SO_4			+ 10 „	
5	n/10 NaOH „ 1 „ + n/10 H_2SO_4			+ 10 „	
6	n/10 NaOH „ sofort + n/10 H_2SO_4			+ 10 „	
7	Trockenserum in Substanz	+ 6 Stdn.			+ 26 Stdn.
8	„ „ 5 proz. Lösung . . .	+ 48 „	+ 24 Stdn.		+ 48 „
9	Mit Chloroform ausgeschüttelt	+ 10 „	+ 45 Min.	+ 30 Min.	
10	„ Äther „			+ 8 Stdn.	—
11	„ Schwefelkohlenstoff „			+ 6 „	—
12	„ Kohle „	—	—	+ 72 „	
13	„ Kaolin „	+ 48 Stdn.	—	+ 72 „	
14	„ Kieselgur „	+ 60 „	—	+ 72 „	
15	„ Chloroform ausgeschüttelt und getrocknet, in 5 proz. Lösung . . .	+ 2 „	+ 1 Std.		
16	„ Schwefelkohlenstoff ausgeschüttelt, dann getrocknet, in 5 proz. Lösung			+ 7 „	
17	„ Alkohol gefällt als Trockensubstanz	+ 6 „	+ 1 „	+ 5 „	
18	„ „ „ in 5 proz. Lösung .	+ 1 Std.	+ 1 „		
19	„ Aceton gefällt als Trockensubstanz			+ 10 „	
20	„ $CaSO_4$ ausgeschüttelt	+ 24 Stdn.	+ 24 Stdn.	+ 48 „	
21	„ Äther „ getrocknet, in 5 proz. Lösung	+ 10 „		—	

Die Fibrinogenlösung hatte 5prom. Albumen und 4,5proz. NaCl. Es wurde immer auf 1 ccm Fibrinogen 1 ccm reaktiviertes Serum zugesetzt, bzw. 0,1 bis 0,2 g Trockensubstanz. + = vollständige Gerinnung. — = Keine Gerinnung. Leere Zeile = entsprechender Versuch nicht angestellt.

alles, auch die Natronlauge-Schwefelsäuremethode, so war aber immer noch die *Ausschüttelung mit Chloroform und Fällung mit Alkohol voll wirksam.*

Wir betonen nochmals, Monate alte, absichtlich bei Zimmertemperatur in offenem Gefäß stehende Sera, die infolgedessen *völlig verfault* waren und mit keiner Methode mehr reaktiviert werden konnten, lieferten *regelmäßig noch wirksames Thrombin nach der Alkoholmethode Alexander Schmidts.* Daß in derartig alten, völlig zersetzten Seren noch ein reaktivierbares Ferment vorhanden sein sollte, widerspricht allem, was wir über Fermente wissen. Daß trotzdem aus solchen fauligen Lösungen ein völlig wirksames Alkoholpräzipitat darstellbar ist, das spricht unserer Meinung nach unzweideutig *gegen* die Fermentnatur des Thrombins und überhaupt *gegen seine biologische Bedeutung.* Man müßte sonst wirklich für das sogenannte Thrombin ganz besondere, allem sonstigen Fermentverhalten zuwiderlaufende Gesetze aufstellen. Dieses von uns aufgefundene verschiedene Verhalten der einzelnen inaktiven Sera betreffs ihrer Reaktivierung, auf der einen Seite die Ausschüttelung mit Adsorbenzien und Dialyse, auf der anderen Seite die Alkohol-Acetonfällung und Ausschüttelung mit Chloroform, ließ uns als Ursache der Reaktivierung neben einer Entfernung hemmender Stoffe auch an dehydrierende Momente denken.

Wir versuchten es zunächst mit der einfachen *Trocknung inaktiver Sera.* Dieselbe erfolgte möglichst rasch im Vakuum. Das Trockenserum wurde dann teilweise als Pulver, teilweise als 5proz. Lösung in 0,9proz. kalkfreier Kochsalzlösung dem Fibrinogen zugesetzt. Auch damit gelang uns in vielen Fällen eine Reaktivierung auch bei solchen Seren, wo Natronlauge-Schwefelsäure versagte. Dabei wirkte das Trockenserum in Substanz rascher als seine Lösung in Kochsalz. Übrigens eine Beobachtung, die uns auch vom frischen Serum her schon lange bekannt ist. So besitzen wir ein frisches Trockenserum, das uns in liebenswürdiger Weise von Geheimrat *Straub* mit seinem Zerstäubungsverfahren in 7 Minuten getrocknet wurde, dasselbe bringt Fibrinogenlösungen in *2 Minuten* zu kompletter Gerinnung, während dasselbe flüssige Serum dazu Stunden gebrauchte. Diese besonders günstige Beeinflussung der *raschen Trocknung* findet sich also auch beim inaktiven Serum bezüglich seiner Reaktivierung.

Daß bei dieser Trockenreaktivierung die Wasserentziehung das Maßgebende ist, zeigten uns weitere Versuche mit *Gips.* Wir schüttelten inaktive Sera mit Gips aus, zentrifugierten dann den Gips ab. Auch dadurch gelang uns vielfach eine Reaktivierung inaktiver Sera (Tabelle III).

Bei der üblichen Reaktivierung der inaktiven Sera wird zur Neutralisation Schwefelsäure benutzt. Die stark entquellende Wirkung der

Schwefelsäure ist bekannt. Es wurden nun entsprechend der *Hofmeister*schen Reihe zur Neutralisation noch andere Säuren herangezogen, so die Citronensäure, Weinsäure, Essigsäure, Salzsäure und Salpetersäure.

Tabelle IV.

Nr.	Reaktivierung	Gerinnungszeiten Inaktives Serum VIII	Inaktives Serum IX
1	äa n/10 NaOH 30 Min. + n/10 Schwefelsäure	+ 6 Stdn.	+ 4 Stdn.
2	„ n/10 NaOH 30 „ + n/10 Citronensäure	+ 7 „	+ 5 „
3	„ n/10 NaOH 30 „ + n/10 Essigsäure . .	+ 7 „	+ 5 „
4	„ n/10 NaOH 30 „ + n/10 Weinsäure . .	+ 7½ „	+ 5½ „
5	„ n/10 NaOH 30 „ + n/10 Salzsäure . .	+ 8 „	+ 7 „
6	„ n/10 NaOH 30 „ + n/10 Salpetersäure	—	+ 7 „

Wie aus Tabelle IV ersichtlich ist, gelingt auch mit diesen Säuren eine Reaktivierung. Die Wirkung läßt sich in abnehmender Reihe wie folgt darstellen:

$$SO_4 > \text{Citrat} = \text{Tartrat} > \text{Acetat} > Cl > NO_3.$$

Wir finden also bezüglich der ***Reaktivierung inaktiver Sera** eine **ähnliche Anionenreihe wie bei der Entquellung.*** Bezüglich der Kationen ließ sich Na durch K und Ca ersetzen, nicht durch Ba und Mg.

Zusammenfassend kommen wir auf Grund unserer Untersuchungen zu folgenden Ergebnissen: Wir müssen bei der ***Reaktivierung inaktiver*** Sera *zweierlei* Methoden unterscheiden, die eine bezweckt die ***Entfernung gerinnungshemmender Stoffe*** (Dialyse, Adsorbenzien), die andere bewirkt eine *Dehydrierung* der *Serumeiweißkörper* (Säureneutralisierung im Sinne der *Hofmeister*schen Reihe, Alkoholfällung, Trocknung, Chloroformausschüttelung usw.).

Daß der Alterungsprozeß einzelner Seren verschieden verläuft nach der Art der Konservierung, je nachdem bakterielle oder autolytische Prozesse im Vordergrund stehen, ist verständlich. Dementsprechend werden auch nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ verschiedene Abbauprodukte in den einzelnen Seren sich vorfinden, und man darf sich deshalb nicht wundern, daß nicht bei allen Seren sämtliche Reaktivierungsmethoden reproduzierbar sind, sondern daß von Fall zu Fall die Methoden variieren. Es wäre durchaus möglich, daß auch hier Differenzen zwischen den einzelnen Tierarten bestehen. Wir kennen, um nur einen Punkt herauszugreifen, die verschiedene Größe des Eiweißquotienten im Blute verschiedener Tiergattungen. Wir werden demnächst auf die Bedeutung des Albumin-Globulinverhältnisses für den Ablauf des Gerinnungsprozesses besonders hinweisen. Derartige Verschiedenheiten dürften auch beim Alterungs-

prozeß bezüglich der Reaktivierung vom Standpunkt der kolloidchemischen Betrachtungsweise nicht unwichtig sein.

In Anbetracht der günstigen Wirkung des Alkohols auch in solchen inaktiven Seren, wo alle übrigen Methoden versagen, scheint uns die Dehydrierung im Reaktivierungsprozeß an erster Stelle zu stehen.

Wir sehen, dem Wesen der von uns aufgefundenen Reaktivierungsmethoden entsprechend, in dieser Reaktivierung ein physikalisches bzw. physikalisch-chemisches Geschehen. Unsere Ergebnisse betrachten wir als weiteren zwingenden Beweis für die Unmöglichkeit des Fermentcharakters des Thrombins, für seine artifizielle Natur und seine von der des Serums durchaus differenten Wirkungsweise.

Man muß doch immer bedenken, daß es sich beim Altern des Serums um ein absterbendes Organ handelt, in dem die verschiedensten Zersetzungsprozesse durcheinander gehen, damit auch den ursprünglich kolloidalen Zustand weitgehend ändern und so wechselnde Reaktivierungsbedingungen schaffen. Daß aber gerade diejenigen Methoden, welche die Fermentchemie sonst zum Inaktivieren der Fermentlösungen benutzt, im speziellen Falle des sogenannten Thrombins, die besten Reaktivierungsergebnisse liefern, das spricht doch ohne Zweifel gegen die Fermentnatur des Thrombins und zugunsten unserer Anschauung.

Wir sehen so auf Grund unserer Untersuchungen in den verschiedenen Möglichkeiten der Reaktivierung des absterbenden Serums nichts anderes als zum Teil eine *Entfernung durch Zersetzung des Serums bedingter, gerinnungshemmender Substanzen*, zum *größeren Teil* aber, in Anbetracht der besonders günstigen Ergebnisse mit Dehydrierungsmethoden, *eine Änderung des kolloidalen Zustandes* der alternden Serumeiweißkörper. Den Begriff Metathrombin müssen wir dementsprechend, wie den des Thrombins, auf Grund dieser Untersuchungen *ablehnen*.

Studien über Cholesterin und seine Ester. II.

Von

E. Keeser.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 28. Januar 1925.)

I.

Frühere Untersuchungen (1) zeigten, daß die Affinität der Cholesterinester zu Wasser mit zunehmender Kohlenstoffkette zunimmt, so daß die hochwertigen Cholesterinester viel stärker hydrophil sind als die niedrigen. Ferner konnte ich nachweisen, daß die Cholesterinester ihre Wasseraffinität auch den Kolloiden mitteilen, an die sie adsorbiert sind, so daß diese Kolloide durch die hochwertigen Cholesterinester weit weniger als durch die niedrigen sensibilisiert werden.

In Fortsetzung dieser Untersuchungen gelang es, an einem Beispiel die Bedeutung der Art des Kations, mit dem sie ein Salz bilden, für die physikalischen Eigenschaften der Cholesterinester zu zeigen. Nach *Mandel* und *Neuberg* (2), die das K- und das Na-Salz der Cholesterylschwefelsäure darstellten, ist nämlich das K-Salz schwerer löslich als das Na-Salz. Ich stellte von diesen beiden Salzen die Sole dar und beobachtete die sensibilisierende Wirkung der millimolaren Sole auf ein Schwefel- bzw. Arsentrisulfidsol.

	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
As_2S_3-Sol	5	5	5	5	5	5	5
+ K-Cholesterylsulfatsol .	5	5	5	5	5	5	5
+ Aqua dest.	0,0	0,2	0,4	0,6	0,7	0,8	0,9
+ m 2 $CaCl_2$	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,1
	+	+	+	+	—	—	—
As_2S_3-Sol	5	5	5	5	5	5	5
+ Na-Cholesterylsulfatsol	5	5	5	5	5	5	5
+ Aqua dest.	0,0	0,2	0,4	0,6	0,7	0,8	0,9
+ m 2 $CaCl_2$	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,1
	+	+	—	—	—	—	—
Schwefelsol	5	5	5	5	5	5	5
+ K-Cholesterylsulfatsol .	5	5	5	5	5	5	5
+ Aqua dest.	0,0	0,2	0,4	0,6	0,7	0,8	0,9
+ m 5 $CaCl_2$	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,1
	+	+	+	+	+	+	—

	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
Schwefelsol	5	5	5	5	5	5	5
+ Na-Cholesterylsulfatsol	5	5	5	5	5	5	5
+ Aqua dest.	0,0	0,2	0,4	0,6	0,7	0,8	0,9
+ m 5 $CaCl_2$	1,0	0,8	0,6	0,4	0,3	0,2	0,1
	+	+	+	+	—	—	—

Die Versuche zeigen, daß das schwerer lösliche K-Salz der Cholesterylschwefelsäure stärker sensibilisierend wirkt als das entsprechende Na-Salz. Es gilt also auch für die Salze der Cholesterinester die Regel, daß das adsorbierte Kolloid seine Wasseraffinität dem Kolloid mitteilt, an das es adsorbiert ist. Gleichzeitig stellen diese Versuche offenbar einen Beitrag zur Kenntnis der verschiedenartigen Ionenwirkungen dar, indem in dem untersuchten Falle die physikalischen Eigenschaften eines Sols bei Anwesenheit beider Salze der Cholesterylschwefelsäure von dem Verhältnis des K- zum Na-Salz bestimmt werden.

In diesem Zusammenhang gewinnt auch die von *Mandel* und *Neuberg* (2) gefundene Tatsache toxikologisches Interesse, daß das Hg- und Ag-Salz der Cholesterylschwefelsäure gut lösliche Verbindungen darstellen, während ihre Verbindungen mit $BaCl_2$, $FeCl_3$, $ZnSO_4$ u. a. unlöslich sind.

II.

Wie die mitgeteilten Versuche zeigen, sind das Cholesterin und seine Ester Stoffe, die auf die Kolloide des Organismus verschieden stark sensibilisierend wirken, und die Frage liegt nahe, ob wir auch Stoffe von ausgesprochen stabilisierender Wirkung besitzen und welcher Art diese sind.

Nach den Untersuchungen von *Fürth* (3) steigt die Dielektrizitätskonstante der wässerigen Lösungen des Harnstoffs mit zunehmender Konzentration an, während die des Harnstoffs in Substanz außerordentlich niedrig ist; ein prinzipiell gleiches Verhalten zeigt das Glykokoll.

Z. B. *Harnstoff*: feste Substanz D. E. K. 3,5 ± 0,2.

Gew.-Proz.	D. E. K.
0,0	80,5
9,1	85
44,8	91,0

Da nun eine Zunahme der D. E. K. des Mediums eine Zunahme der Dissoziation eines in ihm gelösten Stoffes zur Folge haben muß, so lag die Vermutung nahe, daß Harnstoff und Glykokoll stabilisierend wirken. Diese Annahme wurde durch folgende Versuche experimentell bestätigt:

	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
As_2S_3-Sol	5	5	5	5	5	5
+ m/2 $CaCl_2$	8	8	8	8	8	8
+ Aqua dest.	5	4	3	2	1	0
+ Harnstoff (20 proz.)	0	1	2	3	4	5
	++	+	+	±	—	—
Schwefelsol	5	5	5	5	5	5
+ m KCl	2	2	2	2	2	2
+ Aqua dest.	5	4	3	2	1	0
+ Harnstoff (20 proz.)	0	1	2	3	4	5
	+	+	+	±	—	—
As_2S_3-Sol	5	5	5	5	5	5
+ m/2 $CaCl_2$	7	7	7	7	7	7
+ Aqua dest.	5	4	3	2	1	0
+ Glykokoll (10 proz.)	0	1	2	3	4	5
	+	+	+	+	±	—
Schwefelsol	5	5	5	5	5	5
+ m KCl	2	2	2	2	2	2
+ Aqua dest.	5	4	3	2	1	0
+ Glykokoll (10 proz.)	0	1	2	3	4	5
	+	+	+	±	—	—

Daß die Ergebnisse dieser Versuche auf eine durch Harnstoff bzw. Glykokoll bewirkte Erhöhung der D. E. K., die zu einer stärkeren Dissoziation der gelösten Kolloide, infolgedessen zu einer stärkeren Aufladung der einzelnen Partikeln und dadurch zu einer Stabilisierung führt, zurückzuführen sind, ist zwar durch die geschilderten Untersuchungen noch nicht erwiesen, doch möchte ich diese Erklärung als Deutungsmöglichkeit nennen. Es würde sich dann hier um das Gegenstück zu den bekannten Versuchen von *Freundlich* und *Rona* (4) handeln, die eine Sensibilisierung des $Fe(OH)_3$-Sols bei Alkoholzusatz beobachteten und die Ursache hierfür in einer Herabsetzung der D. E. K. an der Oberfläche der Kolloidteilchen infolge einer Adsorption des kapillaraktiven Alkohols erblicken.

Eine andere Deutungsmöglichkeit ergibt sich aus den Versuchen, die *Neuberg* (5) über die sogenannten *hydrotropischen Erscheinungen* angestellt hat und als deren Ursache er physikalische sowie chemische Kräfte ansieht. Ich möchte annehmen, daß es sich hierbei um die Entstehung von neuen chemischen Verbindungen, sogenannten Komplex- oder Additionsverbindungen handelt, zu deren Bildung organische Moleküle — vor allem, wenn sie CO- oder NH_2-Gruppen enthalten — neigen. Daß speziell Harnstoff die Fähigkeit besitzt, die Löslichkeit einer Substanz zu erhöhen, ist eine schon lange bekannte Erfahrungstatsache. Neuerdings (6) ist wieder auf die löslichkeitserhöhende Wirkung des Harnstoffs der Harnsäure gegenüber hingewiesen worden.

und *Weintraut* (7) bezeichnet das Verhältnis Harnsäure : Harnstoff im Urin geradezu als den „Koeffizienten der harnsauren Diathese“.

Es ist hier nicht der Ort, die weiteren, physikalisch-chemischen Untersuchungen, die zur Deutung der obigen und der im folgenden zu schildernden Befunde über das Verhalten des Harnstoffs sowie des Alkohols angestellt wurden, zu besprechen; sie werden an anderer Stelle mitgeteilt.

III.

In Fortsetzung meiner Cholesterinuntersuchungen prüfte ich den Einfluß von Alkohol auf Cholesterin und seine Ester, indem ich Leitfähigkeitsversuche anstellte, die mit Leitfähigkeitswasser bei 18° C ausgeführt wurden. Zur besseren Übersicht wurden die $\varkappa$-Werte mit 10000 multipliziert.

20 ccm Aqua + 0,01 g Cholesterin: $\varkappa$ = 0,241.

a) Äthylalkohol.

20 ccm Alkohol (2,50 proz.) ($\varkappa$ = 0,105) + 0,01 g Cholesterin ($\varkappa$ = 0,592)
20 „ „ (10,0 „) ($\varkappa$ = 0,105) + 0,01 g „ ($\varkappa$ = 0,399)
20 „ „ (25,0 „) ($\varkappa$ = 0,108) + 0,01 g „ ($\varkappa$ = 0,242)
20 „ „ (50,0 „) ($\varkappa$ = 0,109) + 0,01 g „ ($\varkappa$ = 0,119)
20 „ „ (99,8 „) ($\varkappa$ = 0,112) + 0,01 g „ ($\varkappa$ = 0,115)

b) Alkohole der homologen Reihe.

20 ccm Methylalkohol (5 proz.) ($\varkappa$ = 0,0936) + 0,01 g Cholesterin ($\varkappa$ = 0,516)
20 „ Äthylalkohol (5 „) ($\varkappa$ = 0,105) + 0,01 g „ ($\varkappa$ = 0,528)
20 „ Propylalkohol (5 „) ($\varkappa$ = 0,115) + 0,01 g „ ($\varkappa$ = 0,568)
20 „ Isopropylalk. (5 „) ($\varkappa$ = 0,117) + 0,01 g „ ($\varkappa$ = 0,573)
20 „ Butylalkohol (5 „) ($\varkappa$ = 0,120) + 0,01 g „ ($\varkappa$ = 0,663)

	ccm	ccm	ccm	ccm
Cholesterinsol . .	20,0	19,9	19,8	19,7
+ Äthylalkohol . . .	0,0	0,1	0,2	0,3
	$\varkappa$ = 0,381	$\varkappa$ = 0,520	$\varkappa$ = 0,441	$\varkappa$ = 0,363
Cholesteryl-palmitatsol . .	20,0	19,9	19,8	19,7
+ Äthylalkohol . . .	0,0	0,1	0,2	0,3
	$\varkappa$ = 0,405	$\varkappa$ = 0,833	$\varkappa$ = 0,428	$\varkappa$ = 0,254

ccm Aqua dest. 20,0 + ccm Äthylalkohol . .	20,0 0,0	19,9 0,1	19,5 0,5	19,0 1,0	18,0 2,0
I + 0,01 g Cholesterin	$\varkappa$ = 0,299	$\varkappa$ = 0,942	$\varkappa$ = 0,801	$\varkappa$ = 0,740	$\varkappa$ = 0,660
II + 0,01 g Cholesteryl-benzoat	$\varkappa$ = 0,303	$\varkappa$ = 1,260	$\varkappa$ = 0,356	$\varkappa$ = 0,289	$\varkappa$ = 0,197
III + 0,01 g Cholesteryl-palmitat	$\varkappa$ = 0,296	$\varkappa$ = 0,779	$\varkappa$ = 0,292	$\varkappa$ = 0,236	$\varkappa$ = 0,149

Wie die Versuche zeigen, erhöhen die genannten Alkohole in zunehmender Konzentration die Leitfähigkeit des Cholesterins und seiner

Ester abnehmend stark; in hohen Konzentrationen setzen sie ihre Leitfähigkeit, d. h. also auch ihren Dissoziationszustand herab. Da ich vermutete, daß die Ursache für diese Wirkung des Alkohols darauf beruht, daß er in kleinen Mengen den Solvatationszustand des Cholesterins und seiner Ester erhöht, ermittelte ich die Fällungswerte ihrer äquimolaren Sole mit und ohne Alkoholzusatz.

	ccm	ccm	ccm	ccm
Cholesterinsol	10	10	10	10
+ m/4 KCl	0,8	0,6	0,4	0,2
+ Aqua dest.	0,2	0,4	0,6	0,8
I + 0,1 ccm Aqua	+	+	±	—
II + 0,1 „ Alkohol	—	—	—	—

	ccm	ccm	ccm	ccm
Cholesterinsol	10	10	10	10
+ m/3 KCl	1,0	0,8	0,6	0,4
+ Aqua dest.	0,0	0,2	0,4	0,6
I + 0,05 ccm Aqua	grobe Fällung	Fällung	Trübung	—
II + 0,05 „ Alkohol	flockige Trübg.	Trübung	—	—

Die Versuche ergeben eine Zunahme der Stabilität der Sole bei Zusatz von Alkohol. Im Zusammenhang mit den Ergebnissen der Untersuchungen über die Beeinflussung der Leitfähigkeit dieser Sole durch Alkoholzusatz muß demnach seine Wirkung im Sinne einer Peptisation des Cholesterins und seiner Ester gedeutet werden. Die Wirkung des Alkohols, die D. E. K. und damit die Dissoziation in ihm gelöster Stoffe herabzusetzen, überwiegt erst in höheren Konzentrationen seinen peptisierenden Einfluß auf das Cholesterin.

Diese Befunde geben die Erklärung für gewisse, schon bekannte physiologische Beobachtungen. *Ducceschi* (8) fand nämlich bei Menschen und Hunden eine wesentliche Vermehrung des Cholesteringehalts des Blutes nach Alkoholdarreichung. Ferner beobachtete er eine deutliche Zunahme der Fettsäuren, schwächer und nicht konstant eine solche der Phosphatide. Dieser letztere Befund steht übrigens im Gegensatz zu den Untersuchungsergebnissen von *Sieber* (9), der bei Hunden, die längere Zeit Alkohol erhielten, eine starke Abnahme des Phosphatidgehalts fast aller Organe beobachtete. Die Tatsache, daß das, was unter dem Namen Lecithin zusammengefaßt wird, keinen einheitlichen, chemisch wohldefinierten Körper darstellt, ist der Grund dafür, daß ich es in den Bereich der vorstehend geschilderten Versuche zunächst nicht einbegriffen habe.

Zusammenfassung.

1. Die Sole des Cholesterins und seiner Ester teilen ihre Wasseraffinität dem Kolloid mit, an das sie adsorbiert sind.

2. Die Art des Kations, mit dem die Cholesterinester ein Salz bilden, ist von Bedeutung für ihre physikalischen Eigenschaften.

3. Der Zusatz von Harnstoff oder Glykokoll erhöht die Stabilität eines Arsentrisulfid- bzw. Schwefelsols.

4. Methyl-, Äthyl-, Propyl-, Isopropyl- und Butylalkohol erhöhen in zunehmender Konzentration die Leitfähigkeit der Sole des Cholesterins und seiner Ester abnehmend stark; in hohen Konzentrationen setzen sie ihre Leitfähigkeit, d. h. also auch ihren Dissoziationszustand, herab.

5. Die Stabilität der Sole des Cholesterins und seiner Ester wird durch Alkoholzusatz erhöht. Hieraus wird im Zusammenhang mit den unter 4. angegebenen Befunden geschlossen, daß die Wirkung des Alkohols im Sinne einer Peptisation des Cholesterins und seiner Ester gedeutet werden muß.

Literatur.

1) *E. Keeser*, diese Zeitschr. **154**, 321, 1924. — 2) *J. A. Mandel* und *C. Neuberg*, ebendaselbst **71**, 186, 1915. — 3) *R. Fürth*, Ann. d. Phys. **70**, 63, 1923. — 4) *H. Freundlich* und *P. Rona*, diese Zeitschr. **81**, 98, 1917. — 5) *C. Neuberg*, ebendaselbst **76**, 107, 1916. — 6) *K. Harpuder*, ebendaselbst **148**, 355, 1924; vgl. auch *R. Stern*, ebendaselbst **151**, 268, 1924. — 7) *M. Weintraut*, Arch. d. Pharm. u. Ber. d. deutsch. pharm. Ges. 1924, H. 1, S. 48. — 8) *V. Ducceschi*, Arch. ital. de biol. **70**, 93, 1920. — 9) *N. Sieber*, diese Zeitschr. **23**, 304, 1910.

Zur Mikrobestimmung des Blutzuckers.

(Erwiderung auf die Arbeit von *C. J. Diaz* und *B. S. Cuenca*, diese Zeitschr. **153**, 97.)

Von

K. Dresel und H. Rothmann.

(Aus der II. medizinischen Universitätsklinik der Charité, Berlin.)

(Eingegangen am 30. Januar 1925.)

Diaz und *Cuenca* geben an, daß es ihnen nicht gelungen ist, mit der von uns[1]) für die *Hagedorn*- und *Jensen*schen Blutzuckerbestimmung vorgeschlagenen Blättchenmethode Werte zu erhalten, die den mit Hilfe der Pipette gewonnenen Werten entsprechen. Sie erhielten zu niedrige und niemals übereinstimmende Resultate und führen dies darauf zurück, daß der Zucker aus den Blättchen infolge der Eiweißfällung nicht völlig extrahiert wird. Dementsprechend konnten sie auch nach Zerkleinerung der Blättchen den zurückgebliebenen Zucker nachweisen.

Wir haben uns daraufhin vergeblich bemüht, Bedingungen herauszufinden, unter denen unsere Methode falsche Resultate ergibt. Wir haben mit Blut und mit Serum gearbeitet und immer vorzügliche Resultate erhalten. Wir haben uns Blättchen von verschiedenen Fabriken beschafft [Leitz, Schleicher u. Schüll (Düren)] und haben immer dann richtige, d. h. mit den Pipettenbefunden übereinstimmende Werte erhalten, wenn die Blättchen, wie das zumeist der Fall ist, untereinander gleich groß waren und gleiche Leerbestimmungen ergaben.

Inzwischen sind unsere Befunde von *Dingemanse*[2]) aus dem Amsterdamer pharmakotherapeutischen Institut aufs einwandfreieste durch mehr als tausendfache Untersuchungen bestätigt worden. Wir hätten danach kaum noch Veranlassung genommen, den Herren *Diaz* und *Cuenca* zu erwidern, wenn es uns nicht bei dem Suchen nach dem Fehler, der den spanischen Autoren doch anscheinend unterlaufen ist, gelungen wäre, einen weiteren Vorteil der Blättchenmethode zu finden. Es hat sich gezeigt, daß die Exaktheit der Blutzuckerbestimmung nicht darunter leidet, wenn man das Blut in den Blättchen eintrocknen läßt und die Bestimmung erst einige Tage später vornimmt. Noch 4 Tage nach der Blutentnahme (länger wurde nicht gewartet) erhielten wir absolut den gleichen Wert wie

---

[1]) Diese Zeitschr. **146**, 538, 1924.

[2]) Ebendaselbst **154**, 483, 1924.

bei sofortiger Bestimmung. Die in flüssigen Medien sehr bald eintretende Glykolyse wird also durch die Eintrocknung verhindert, und beim Kochen geht nachher der Zucker völlig aus den Blättchen heraus.

Die Bedeutung dieses Befundes einmal besonders für den Praktiker, dann aber auch für das wissenschaftliche Laboratorium liegt auf der Hand. Der Praktiker kann das Blut seiner Patienten zur Zuckerbestimmung an eine Untersuchungsstelle senden, und im Laboratorium können die Blättchen eines sich eventuell über 24 Stunden und länger erstreckenden Versuchs gemeinsam auf ihren Zuckergehalt geprüft werden.

Wir sind den Herrn *Diaz* und *Cuenca* dankbar, daß wir durch die Nachprüfung ihrer Arbeit auf diesen großen Vorteil der Blättchenmethode aufmerksam gemacht worden sind, sind aber außerstande, zu sagen, welcher Fehler ihnen bei ihren Bestimmungen unterlaufen ist.

Untersuchungen zur Frage der Wasserbindung in Kolloiden und tierischen Geweben.

Von

F. Thoenes.

(Aus der Universitäts-Kinderklinik Leipzig.)

(Eingegangen am 2. Februar 1925.)

Das Studium der Lebensvorgänge unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen hat die Forschung in den letzten Jahrzehnten auf den Wert physikalisch-chemischer, speziell kolloidchemischer Betrachtungsweise hingeführt und die Bedeutung einer normalen physikalischen Struktur des Protoplasmas für die Lebensfähigkeit der Organe neben einer normalen chemischen Beschaffenheit erwiesen.

Mit dieser Erkenntnis gewinnt die Betrachtung der für den Aufbau des Organismus notwendigen Wassermengen eine besondere Bedeutung: Aus einer rein quantitativ analytischen Frage ist ein physikalisch-chemisches Problem geworden. So kann es heute nicht mehr genügen, nur die Menge des in den Geweben enthaltenen Wassers festzustellen, es gilt vielmehr zu klären, in welcher Form das Wasser darin enthalten ist, d. h. in welcher Beziehung es zu den Teilchen des Protoplasmas steht. Mit der den Anschauungen der Gegenwart entsprechenden Annahme einer Sol-Gelstruktur des Protoplasmas dürfen wir uns von der Übertragung der in der Kolloidchemie heimischen Vorstellungen von der Wasserbindung in Kolloiden auf die lebende Substanz der Organe Erfolg versprechen, wenn wir dabei auch nicht entscheiden wollen, ob es statthaft sei, die Zellkomplexe tierischer Organe in restlose Analogie zu den unbelebten Gelen eines Gelatine-Lipoidgemisches zu setzen, oder ob „die Anwendung der Theorien kolloider Lösungsgemische auf die tierischen Organe nicht doch einiger Ergänzung bedarf (*Fürth*). In Anlehnung an die Vorstellungen, die *Wo. Ostwald* bei der Erforschung der Wasserbindung im Torf entwickelt, können wir in einem quellbaren System mehrere Arten der Wasserbindung unterscheiden: Das in größeren Hohlräumen ähnlich den Poren eines Schwammes enthaltene Okklusionswasser und Adhäsionswasser, das in Räumen von kapillaren Dimensionen festgehaltene Kapillarwasser, das durch osmotische Kräfte in abgeschlossenen Hohlräumen fixierte osmotische Wasser und schließlich

das durch Teilchen kolloider Größenordnung durch physikalische Kräfte gebundene Kolloidwasser, dem noch ein gewisser Prozentsatz chemisch gebundenen Wassers an die Seite zu stellen wäre. Die Summe der in einem quellbaren Körper enthaltenen Wassermengen verschiedener Kategorie macht die Gesamtmenge des Quellwassers aus, das sich durch verschiedene Intensität der Bindung auszeichnet, je nach dem Anteil, den die verschiedenen Kräfte an der Fixierung des Wassers nehmen. Die damit gegebene Definition des Quellwassers als der gesamten Menge des in einem quellbaren System unabhängig von der *Art* seiner Bindung enthaltenen Wassers ist als wesentlich für die Verständigung hervorzuheben. Nach *Wo. Ostwald* und *H. Freundlich* ist unter Quellung ganz allgemein die Aufnahme von Wasser durch feste Körper unter Volumenzunahme, unter Entquellung der diesem entgegenlaufende Vorgang zu verstehen, ohne damit über die *Art* der Wasserbindung Näheres auszusagen. In der Biologie wird von dieser in der Kolloidchemie gebräuchlichen Begriffsformulierung häufig abgewichen und der Begriff der Quellung oder Entquellung identifiziert mit einer Vermehrung bzw. Verminderung von kolloidgebundenem Wasser. Im Interesse der Einheitlichkeit halten wir es für richtiger, die in der allgemeinen Kolloidchemie festgelegten Begriffe auch auf biologische Probleme zu übertragen, wo wir es meist — soweit es sich um ganze Organe handelt — mit höchst komplizierten Kolloidkomplexen zu tun haben. Wir werden also nur dann von einer Quellung oder Entquellung eines Organs zu sprechen haben, wenn damit eine Zunahme oder Abnahme des Wassergehalts verbunden ist, und den Quellungsgrad in Übereinstimmung damit als die Menge des in einem quellbaren System enthaltenen Wassers in Beziehung zur Einheit der Trockensubstanz zu definieren haben (Kapazität der Wasserbindung nach *W. Kuhn*). Darüber hinaus geht unser Interesse aber darauf aus, den Quellungszustand noch etwas mehr zu charakterisieren, und zwar durch die *Art* der Wasserbindung, wie sie bei einer Prüfung der Festigkeit der Wasserbindung zum Ausdruck kommt (Intensität der Wasserbindung nach *W. Kuhn*). Diesem Ziele strebten verschiedene Forscher auf mannigfachen Wegen zu. So z. B. *van Bemmelen*, *Zsigmondy*, *Katz* u. a. durch Aufstellung von Dampfdruckisothermen, *Wo. Ostwald* und *Bürkheimer* durch Feststellung der Verdampfungsgeschwindigkeit des Wassers. Dabei ist es gelungen, verschiedene Typen von Gallerten und Kolloiden durch die Intensität ihrer Wasserbindung zu charakterisieren. Ungelöst mußte aber die rein quantitative Frage nach dem Mengenverhältnis bleiben, in dem das Wasser durch die verschiedenen Kräfte in den Gallerten verankert wurde. Und das ist gerade die brennende Frage, deren Lösung für die Weiterentwicklung der reinen Kolloidchemie ebenso bedeutungsvoll sein dürfte, wie für ihre Anwendung auf physiologische und pathologische Probleme.

Im Jahre 1922 hat nun *Max Rubner* eine umfangreiche Studie über die Wasserbindung in Kolloiden und tierischen Geweben veröffentlicht, die dem Ziele zustrebt, das darin enthaltene Wasser in einen freien und einen gebundenen Anteil zu differenzieren und die Größe dieser Anteile zu bestimmen. Von den dazu ausgearbeiteten und angewandten Methoden erschien uns ganz besonders das sich der Kalorimetrie bedienende Verfahren beachtenswert, weil es mit verhältnismäßig einfachen Mitteln arbeitet und geeignet erschien, zahlenmäßige Unterlagen über die Wasserverteilung im Gewebe zu geben, und damit auch wichtigen pathologisch-physiologischen Problemen zu dienen.

Aus diesen Gesichtspunkten heraus haben wir die Methodik in einer großen Anzahl von Fällen (etwa 50) zur Anwendung gebracht und dabei einer Nachprüfung unterzogen, deren Ergebnis im folgenden mitgeteilt werden soll.

Die *Rubner*sche Methodik beruht, ebenso wie die von *Müller-Thurgau* bereits im Jahre 1910 ausgeführten und jetzt von *W. Kuhn* der Kritik unterzogenen Versuche, auf der Voraussetzung, daß das an Kolloide gebundene Wasser bei Abkühlung auf tiefe Temperaturen (um -20^0) nicht der Vereisung unterliegt, im Gegensatz zu dem freien Wasser, das dabei gefriert und infolgedessen kalorimetrisch bestimmt werden kann. Voraussetzung für die Brauchbarkeit der Methode ist neben obiger Prämisse zunächst, daß die Bindung des Wassers durch die starke Abkühlung nicht wesentliche Veränderung erleidet. Dies ist aber nicht ohne weiteres als feststehende Tatsache anzunehmen. Wissen wir doch aus den Untersuchungen von *H. W. Fischer* und *Bobertag* u. a., daß Gallerte unter dem Einfluß des Gefrierens in ihrer physikalischen Struktur tatsächlich verändert werden. Wir werden damit zu rechnen haben, daß unter dem Einfluß der Kälte ein Teil des gebundenen Wassers — wenigstens vorübergehend — frei wird und somit bei der Bestimmung als freies Wasser imponiert. Wenn dies zutrifft, müssen wir uns darüber klar sein, daß die von uns festgestellten Werte für das gebundene Wasser nur *die* Menge erfaßt, *die auch unter dem Einfluß der Kälte* noch festgehalten wird. Ohne diesen Einfluß hingegen würden wir mit einer größeren Menge gebundenen Wassers wohl zu rechnen haben. Wir prüfen also mit der *Rubner*schen Methodik, um mit *Kuhn* zu sprechen, wohl auch nur die Intensität der Wasserbindung.

Unter diesen Voraussetzungen ist die Brauchbarkeit der Methode nur dann gesichert, wenn es uns gelingt, festzustellen, daß die beim Gefrieren der Gallerten sich abspielenden Vorgänge in der Weise gesetzmäßig verlaufen, daß die dabei sich ergebenden Werte für das gebundene Wasser reproduzierbar sind. Dies zu erproben, muß, ganz besonders in Anwendung auf die tierischen Gewebe, unsere wichtigste Aufgabe sein.

Die Technik.

Wir haben uns bemüht, unsere Versuchsanordnungen in enge Anlehnung an die von *Rubner* erteilten Vorschriften zu gestalten. Wir halten es aber für wichtig, in Anbetracht der recht spärlichen technischen Angaben in der *Rubner*schen Arbeit, den Gang der Untersuchung ausführlich zu beschreiben.

Unser Kalorimeter besteht aus zwei ineinandergesetzten Dewargefäßen, von denen das Innere mit einer seitlichen Einwurfsöffnung versehen, einem

Normalthermometer mit $^1/_{10}$-Gradeinteilung und einem Glasrührer armiert ist. Der Gang dieses Kalorimeters ist sehr gering und beträgt bei Verwendung von Wasser, das die Temperatur des Versuchsraums hat, nur einige tausendstel Grade in der Minute. Er ist also leicht zu vernachlässigen. Die Wärmekapazität des Apparats ergab sich, bei einer Bestimmung nach *Rubners* Angaben durch Einwerfen von Eisstückchen, mit 15 Cal. Die auf der analytischen Wage gewogenen, leicht in Stanniol gehüllten Materialproben wurden in Reagenzgläser gebracht und während 3 Stunden in einer Kältemischung von ungefähr -20^0 bewahrt. Ein in die Reagenzgläser eingeführtes Normalthermometer mit $^1/_{10}$-Gradeinteilung gestattete, bei Beginn des Versuchs die Temperatur des Versuchsmaterials abzulesen. Dieses wurde nach Ablesung der Temperatur rasch durch die seitliche Öffnung in das Kalorimeter geworfen und das Sinken der Temperatur unter leichtem Rühren bis zum Stillstand des Meniskus beobachtet. Danach wurde in dem verwandten Material der Trockengehalt bestimmt.

Die Berechnung des Ergebnisses wurde nach der *Richmann*schen Regel vorgenommen. Ihr liegt folgende Überlegung zugrunde. Um x g Eis von der Temperatur T_0 aufzutauen, muß es zunächst auf die Temperatur 0^0 gebracht werden. Dies erfordert, bei einer spezifischen Wärme des Eises von 0,5,

$$x/_2 \,.\, T_0 \,\text{Cal}, \tag{1}$$

das Schmelzen des Eises hingegen

$$80 \,.\, x \,\text{Cal}. \tag{2}$$

Die Erwärmung der dabei entstandenen Wassermenge auf die Endtemperatur des Kalorimeters T_1 verbraucht

$$x \,.\, (T - T_1) \,\text{Cal}, \tag{3}$$

wobei T die Anfangstemperatur des Kalorimeters zu bedeuten hat. Zu diesen drei Summanden tritt noch ein vierter, der die Kalorienmenge darstellt, welche zur Erwärmung des nicht vereisbaren Wassers und der Trockensubstanz auf die Endtemperatur des Kalorimeters notwendig ist. Wenn wir die Gesamtmenge der Frischsubstanz mit a und seine spezifische Wärme mit s bezeichnen, so ergibt sich dafür der Wert

$$(a \,.\, s - x) \,.\, (T_1 + T_0). \tag{4}$$

Die Summe dieser vier Summanden gibt die Wärmemenge an, die bei dem Schmelzungsprozeß verbraucht wurde, und ist gleich zu setzen der Wärmemenge, die von dem Kalorimetersystem mit der Kapazität C abgegeben wurde. Sie beträgt

$$C \,.\, (T - T_1). \tag{5}$$

Daraus ergibt sich schließlich für die Menge des vereisten Wassers der Wert X:

$$X = \frac{C \,.\, (T - T_1) - a \,.\, s \,.\, (T_1 + T_0)}{80 - \frac{T_0}{2}}.$$

In diesem Ausdruck ist T_0 mit positivem Vorzeichen einzusetzen. Der Gesamtwassergehalt der Materialprobe, vermindert um die Menge x des vereisbaren Wassers, ergibt die gesuchte Menge des gebundenen Wassers.

Tabelle 1.

Versuch	Material	1. Quellung [1] Gesamt-H_2O Proz.	Freies H_2O Proz.	Gebundenes H_2O Proz.	auf 1 g Trockensubstanz geb. Wasser in g	Versuch	2. Quellung [2] Gesamt-H_2O Proz.	Freies H_2O Proz.	Gebundenes H_2O Proz.	auf 1 g Trockensubstanz geb. Wasser in g
I a	Laminaria in Aqua dest.	58,1	21,1	37,0	0,88	I b	75,3	48,8	26,5	1,06
	p_H 5,5	58,2	18,9	39,3	0,94		75,3	50,5	24,8	1,00
II a	Laminaria in Aqua dest.	58,3	21,3	37,0	0,88	II b	75,4	51,3	24,1	0,98
	p_H 5,5	61,2	23,3	37,9	0,97		78,0	55,2	22,8	1,03
II c	Laminaria in KOH	63,0	28,4	34,6	0,93	II d	78,5	54,0	24,5	1,14
	p_H 8,0	62,0	28,2	33,8	0,89		78,2	51,8	26,4	1,21
III a	Laminaria in Aqua dest. p_H 6,2	69,8	32,4	37,4	1,19	III b	82,2	52,9	29,3	1,63
III c	Laminaria in 0,8 n Essigs.	59,4	14,3	45,1	1,12	III d	72,8	32,9	39,2	1,40

[1]) Für Versuch 1 und 2 5 Stunden, für Versuch 3 6 Stunden Quellzeit.
[2]) Für Versuch 1 und 2 19 Stunden, für Versuch 3 24 Stunden Quellzeit.

Versuche.

Zunächst haben wir die bereits von *Rubner* an Laminaria vorgenommenen Quellungsstudien wiederholt und etwas erweitert. Wir bedienten uns dabei eines Materials aus unbearbeiteten Laminariastengeln mit 62 Proz. Trockensubstanz. Die Trockensubstanz enthielt im Durchschnitt 16,97 Proz. Asche.

Versuch 1 bis 3. 2,7262 g und 2,3464 g Rohlaminaria wurden in destilliertem Wasser mit einem p_H von 5,5 gelegt und hatten nach 5 Stunden ein Gewicht von 4,0599 und 3,4648 g angenommen. Dies entspricht einem absoluten Wassergehalt von 58,1 und 58,2 Proz. Der Gefrierversuch ergab 21,1 und 18,9 Proz. vereisbares Wasser.

Danach wurden die gleichen Stücke nochmals in das gleiche Wasser gebracht und nach insgesamt 19 Stunden Quellzeit gewogen. Ihr Gewicht betrug jetzt 6,8578 und 5,8376 g mit 75,3 Proz. Wasser. Der Gefrierversuch ergab nun 48,8 und 50,5 Proz. vereisbares Wasser. Durch Wiederholung des Versuchs prüften wir nun, wieweit die erhobenen Werte zu reproduzieren seien. Gleichzeitig gaben wir zwei Stücke von dem gleichen Material zur Quellung in ganz schwache Kalilauge von p_H 8,0. Der Verlauf der

Gefrierversuche soll hier unter Hinweis auf die Protokolle nicht ausführlich erörtert werden. Sie werden nach den obigen Ausführungen nach Tabelle I verständlich sein, ebenso wie die Versuche 3, die in stark essigsaurem Milieu vorgenommen wurden (Tabelle I).

Zusammenfassend können wir sagen, daß die Werte für das gebundene Wasser mit einer Fehlerbreite von ungefähr 10 Proz. zu reproduzieren sind. Im alkalischen Milieu geht die Wasseraufnahme etwas rascher vonstatten, erreicht nach 24 Stunden ihr Maximum und zeigt eine deutliche Steigerung der Wasserbindung im Vergleich zu der Quellung in destilliertem Wasser vom p_H 5,5. In stark essigsaurem Milieu liegen die Dinge anders. Hier ist am Ende der Quellung die gesamte Menge der Quellflüssigkeit, ebenso wie die des gebundenen Wassers geringer als in destilliertem Wasser.

Versuch 4 und 5. Die folgenden Versuche wurden mit käuflichem Gelatine- und Agarmaterial angestellt. Von einer hochprozentigen Lösung wurden durch Verdünnung mit gleichen Mengen verschieden starker Salzsäure Gelatinelösungen von unterschiedlichem Säuregehalt hergestellt und unter gleichen Bedingungen zum Erstarren gebracht. Die daraus entnommenen Proben ergaben die in Tabelle II wiedergegebenen Werte (Tabelle II). Den Vergleich einer Gelatine mit einer Agargallerte ergibt

Tabelle II.

Versuch	Material	Gesamt-Wasser	Freies Wasser		Gebundenes Wasser	Auf 1 g Trockensubstanz geb. Wasser
		Proz.	Proz.		Proz.	g
4a	Gelatine p_H 5,3	87,0	60,5 65,1	62,8	24,2	1,86
4b	Gelatine p_H 4,2	86,4	60,7 59,8	60,25	26,2	1,92
4c	Gelatine p_H 3	87,1	60,9 58,1	59,5	27,6	2,14
4d	Gelatine bläut Kongo stark	86,7	53,4 55,6	54,5	32,2	2,42

Tabelle III. Sie läßt erkennen, daß eine Agargallerte im Vergleich mit einer Gelatinegallerte von ungefähr gleichem Gehalt an Trockensubstanz einen wesentlich höhern Prozentsatz gebundenen Wassers aufweist. Während

Tabelle III.

Versuch	Material	Gesamt-Wasser	Freies Wasser	Gebundenes Wasser	Auf 1 g Trockensubstanz geb. Wasser
		Proz.	Proz.	Proz.	g
5b	Gelatine p_H 5,5	92,4 92,3	73,5 74,4	18,9 17,9	2,48 2,32
5a	Agar p_H 5,5	94,1 94,1	69,9 69,2	24,2 24,9	4,10 4,20

sich in Versuchen mit Laminarina gut reproduzierbare Werte für das gebundene Wasser erzielen ließen, konnten wir für Gelatine dies nicht in befriedigender Weise erreichen. Wir glauben allerdings zunächst nicht dies der Methode zur Last legen zu dürfen, weil es ja bekannt ist, daß der physikalische Zustand einer Gelatinegallerte sehr von ihrer Vorbehandlung abhängig ist. Und es dürfte nur schwer möglich sein, diese für zwei nacheinander hergestellte Gallerten völlig gleich zu gestalten. Immerhin wird es zweifellos weiterer Untersuchungen bedürfen, um den Wert oder Unwert der Methode auch für dieses Material zu erweisen.

Versuch 6 bis 13. In Fortsetzung obiger Versuche haben wir uns dann der Bearbeitung tierischer und menschlicher Muskulatur gewidmet, in Analogie mit den schon von *Rubner* angestellten Versuchen. Wir hielten es von Bedeutung, insbesondere für das spätere Studium pathologischer Verhältnisse, festzustellen, wie die Wasserbindung sich in tierischer und menschlicher Muskulatur unmittelbar nach dem Tode darstellt; wir mußten danach streben, dafür Normalwerte zu gewinnen, zumal aus den Ausführungen *Rubners* nicht hervorgeht, wie lange nach dem Tode die von ihm verwandten Proben dem Versuchstier entnommen worden sind. Im Zusammenhang damit mußte weiterhin studiert werden, welchen Einfluß die nach dem Tode einsetzenden Prozesse auf die Wasserbindung in der Muskulatur auszuüben imstande sind. Die Klärung dieser Frage erscheint von besonderem Interesse im Hinblick auf die Genese der Totenstarre, die ja mit einer Quellung der Muskeleiweißkörper in Verbindung gebracht wird. Bei der Ausführung der Versuche hielten wir uns an die gleiche Methode, die oben beschrieben wurde. Neben Trockensubstanzbestimmungen wurden Fettbestimmungen vorgenommen, der Wassergehalt auf fettfreies Material berechnet und als Endwert das Mittel aus drei, mindestens zwei Bestimmungen genommen. Die Versuchstiere wurden durch Nackenstich rasch getötet und entblutet, das Material noch lebenswarm entnommen und sofort nach Feststellung des Gewichts auf der analytischen Wage so rasch als eben möglich eingefroren. Für die spezifische Wärme der Muskulatur wurde der von *Rubner* ermittelte Wert von 0,83 bei einem Wassergehalt von 79 Proz. zugrundegelegt (Tabelle IV).

Die in Tabelle IV zusammengestellten Ergebnisse lassen erkennen, daß mit zunehmendem Alter die Menge des gebundenen Wassers abnimmt, daß die mit der Entwicklung fortschreitende Abnahme des Wassergehalts der Gewebe im wesentlichen auf Kosten des gebundenen Wassers geht, das sich bei Berechnung auf 1 g Trockensubstanz allmählich dem Werte 1 nähert. Zu diesem Zahlenwerte sind wir auch bei der Untersuchung eines 9jährigen und eines 1½jährigen Kindes gekommen. Leider ist es uns bisher nicht möglich gewesen, älteres Tier- oder Menschenmaterial heranzuziehen. Es wäre wohl möglich, daß dabei noch niedrigere Werte für das gebundene Wasser ermittelt würden. Dies könnte auch erklären, daß die von *Rubner* ermittelten Zahlen für das gebundene Wasser in „frischem Fleisch (totes Material)" mit 0,75 g auf 1 Teil Trockensubstanz angegeben werden.

Für die Bewertung obiger Ergebnisse ist es wichtig, den Einfluß postmortaler Veränderungen, insbesondere der Säurebildung im Muskel, auf die mit *Rubners* Methode zu erzielenden Ergebnisse zu studieren. Nachdem hauptsächlich auf Grund der Untersuchungen *Fürths* und seiner Schule die Totenstarre als ein vermehrter Quellungszustand kontraktiler Elemente infolge postmortaler Milchsäureanhäufung in der Muskulatur gedeutet

Tabelle IV.

Versuch	Material	Gesamt-Wasser Proz.	Freies Wasser Proz.	Gebundenes Wasser Proz.	Auf 1 g Trockensubstanz geb. H_2O g
6	Neugeborener Hund, 48 Std. alt (Wurf I)	85,7	59,0	26,7	1,86
7	Hund, 3 Wochen alt (Wurf I)	83,8	60,4	23,4	1,44
8	Hund, 4 Wochen alt (Wurf II)	83,3	59,7	23,6	1,40
9	Mehrere Monate alter Hund (Wurf III)	79,3	55,1	24,2	1,16
10	Desgl. (Wurf IV)	82,0	62,9	19,1	1,06
11	Desgl. (Wurf V)	79,7	58,3	21,4	1,05
12	Junges Meerschweinchen, 160 g	81,6	61,5	20,1	1,09
13	Altes Meerschweinchen, 600 g	79,6	60,5	19,2	0,94

wird, erscheint diese Aufgabe ganz besonders reizvoll, weil sie gleichzeitig einen Versuch darstellt, der Lösung des Totenstarreproblems auf dem Wege kolloidchemischer Methodik näherzukommen. Wir sind dabei zunächst so vorgegangen, daß wir in der Muskulatur von Kinder- und Tierleichen sofort nach dem Tode die Menge des gebundenen Wassers bestimmten. Die Leichen wurden danach an kühlem Orte aufbewahrt. Nach Eintritt der Totenstarre wurde dann mit der analogen Muskulatur der anderen Extremität die gleiche Untersuchung vorgenommen. Dabei konnten wir aber keine Unterschiede in der Wasserbindung, sondern nur die gute Reproduzierbarkeit der im ersten Versuch erhaltnen Werte ermitteln. Wir sind darauf dazu übergegangen, die Tiere nach Entnahme der ersten Probe für mehrere Stunden im Brutschrank bei 37° C aufzubewahren, in der Vorstellung, dadurch die Milchsäurebildung und den Eintritt der Totenstarre nicht nur zu beschleunigen, sondern auch zu verstärken. Das Ergebnis dieser Versuche ist in Tabelle V auszugsweise zusammengestellt. Sie ergaben, daß der Nachweis einer Änderung der Wasserbindung mit dem Eintritt der Totenstarre auch unter diesen veränderten Bedingungen nicht immer gelingt. In den meisten Fällen fanden wir für den totenstarren Muskel die gleichen Werte wie für den frischen. Nur in Versuch 14 und 15 ließ sich in gut übereinstimmenden Werten eine weit über die Fehlergrenzen der Einzelbestimmungen hinausgehende Änderung nachweisen. Wir sind nicht in der Lage, uns ein klares Bild von den Ursachen dieses wechselvollen Verhaltens zu machen. Vielleicht ist daran nur die relativ geringe Empfindlichkeit unserer Methodik schuld. Wir halten es aber nicht für ausgeschlossen, daß es gelingen könnte, bei jedem einzelnen Tiere eine Änderung des Wasserbindungsgrades im Verlauf der Totenstarre nachzuweisen, wenn es möglich wäre, den Punkt maximalster Wasserbindung für unsere Bestimmung heranzuziehen. Bei der Unübersichtlichkeit der den Eintritt und Verlauf der die Totenstarre bedingenden Umstände wird es stets schwierig sein,

Tabelle V.

Versuch	Material	Gesamt-Wasser Proz.	Freies Wasser Proz.		Gebundenes Wasser Proz.	Auf 1 g Trockensubstanz geb. H_2O g
15	Meerschweinchen, sofort nach dem Tode	79,6	59,4 58,9 63,1	60,5	19,1	0,94
	Nach 2stünd. Aufenthalt im Brutschrank	79,8	55,9 56,4 57,4	56,5	23,3	1,15
16	Hund, sofort nach dem Tode	82,0	62,4 65,0 61,4	62,9	19,1	1,06
	Nach 5stünd. Aufenthalt im Brutschrank	81,7	53,3 50,6	51,9	29,8	1,63
17	Hund, sofort nach dem Tode	79,3	54,0 55,0 56,4	55,1	24,2	1,16
	Nach 5stünd. Aufenthalt im Brutschrank	78,8	56,4 52,7 54,9	54,7	24,1	1,13

gerade dieses Maximum aufzufinden. Müssen wir uns doch darüber klar sein, daß die Wärme nicht nur das Eintreten, sondern auch die Lösung der Starre befördert, daß folglich das Maximum in seinem zeitlichen Verlauf verkürzt wird. Zur weiteren Klärung haben wir noch einen Versuch angeschlossen, der seine Entstehung der Beobachtung verdankt, daß lebenswarm rasch eingefrorene Muskulatur beim Auftauen momentan in starren Zustand gelangt. Und zwar ist die dabei auftretende Starre wesentlich intensiver, als sie unter gewöhnlichen Umständen zu beobachten ist. Man pflegt diese schon seit *Herrmann* bekannte Beobachtung durch eine

Tabelle VI.

Versuch	Material	Gesamt-Wasser Proz.	Freies Wasser Proz.		Gebundenes Wasser Proz.	Auf 1 g Trockensubstanz geb. Wasser g
18	Hund, sofort nach dem Tode eingefroren	79,7	59,4 56,8 59,4	58,3	21,4	1,05
	Nach 2stünd. Aufenthalt im Brutschrank	79,3	55,7 56,8	56,2	23,1	1,11
	Sofort nach dem Tode eingefroren; nach 4 Std. aufgetaut und nochmals eingefroren	81,0	55,9 54,8 52,2	54,6	26,4	1,38

mit dem Auftauen explosionsartig in Gang kommende Milchsäurebildung zu erklären. Daran anknüpfend haben wir Muskelproben untersucht, die, sofort nach dem Tode entnommen, zunächst für mehrere Stunden vereist und dann wieder aufgetaut wurden. Nachdem wir uns überzeugt hatten, daß sich die Muskelstücke nach dem Auftauen fest kontrahiert anfühlten, wurden sie nochmals vereist und kalorimetrisch verarbeitet. Auf diesem Wege gelingt der Nachweis einer Änderung der Wasserbindung im Zustande der Starre mit größerer Sicherheit (Tabelle VI).

Zusammenfassung.

1. Die Nachprüfung der von *Rubner* ausgearbeiteten kalorimetrischen Methodik zur Bestimmung des freien und gebundenen Wassers in Kolloiden hat, insbesondere in Anwendung auf tierische Gewebe, die gute Reproduzierbarkeit der Werte ergeben. Diese selbst dürfen zunächst nicht als ein direktes Maß für die tatsächlich im Leben vorhandene Menge gebundenen Wassers, sondern nur als Ausdruck der Intensität der Bindung angesehen werden. Im Leben wird die Menge des gebundenen Wassers wahrscheinlich größer sein, als die mit der Gefriermethode ermittelten Werte angeben. Diese sind infolgedessen nicht als absolute, sondern nur als relative Werte anzusehen, die allerdings Rückschlüsse auf die tatsächlichen Verhältnisse zulassen.

2. Bei neugeborenen Tieren ist die Menge des gebundenen Wassers wesentlich größer als bei älteren Tieren. Mit dem fortschreitenden Wachstum geht nicht nur eine Verminderung der Gesamtmenge des Gewebswassers einher, es findet vielmehr gleichzeitig eine Veränderung der physikalischen Struktur der Gewebskolloide im Sinne einer Verminderung des an die Protoplasmakolloide gebundenen Wassers statt.

3. Der Nachweis einer vermehrten Wasserbindung im totenstarren Muskel im Vergleich mit frischem Material gelingt mit der Gefriermethode nur unter Einhaltung bestimmter Versuchsbedingungen.

Literatur.

Van Bemmelen, Zeitschr. f. anorg. Chem. **5**, 1894; zitiert nach *Freundlich*. – *H. W. Fischer*, Beitr. z. Biol. d. Pflanzen 1910; zitiert nach *Lepeschkin*. — *Fischer* und *Bobertag*, diese Zeitschr. **18**, 1909. — *Fürth*, Ergebn. d. Physiol. **17**, 1919. — *Derselbe*, Oppenheimers Handb. d. Biochem. 1923. — *Freundlich*, Kapillarchemie 1922. — *Katz*, Kolloidchem. Beihefte **9**, 1917. — *W. Kuhn*, Kolloidzeitschr. **35** (Literatur). — *Lepeschkin*, Kolloidchem. d. Protoplasmas 1924. – *Müller-Thurgau*, zitiert von *H. W. Fischer*, Kohns Beitr. z. Biol. d. Pflanzen. — *Wo. Ostwald*, Praktikum d. Kolloidchem. Steinkopff, 1921. —

Derselbe, Kolloidzeitschr. **29**. — *Derselbe*, ebendaselbst **30**. — *Derselbe*, Tagung der Kolloidchem. Ges. **1924**. — *Rubner*, Ber. d. preuß. Akad. d. Wissensch. 1922; physik.-mathem. Klasse Nr. 1. — *Derselbe*, diese Zeitschr. **148**. — *Thoenes*, Tagung d. Deutsch. Ges. f. Kinderheilk. **1924**. — *Zsigmondy*, Zeitschr. f. anorgan. Chem. **71**, 1911; zitiert nach *Freundlich*. — *Derselbe*, ebendaselbst **75**, 1912.

Protokolle zu Versuch 1 bis 3.

Versuch	Angewandte Menge	T_0	T	T_1	
1a	4,0599	— 17,8	20,48	18,13	Protok. Nr. 29
	3,4648	— 17,0	19,81	17,91	
1b	6,8578	— 16,8	19,88	14,08	„ „ 29
	5,8376	— 18,6	17,96	13,10	
2a	4,1194	— 17,6	17,5	15,13	„ „ 32
	3,6750	— 16,8	18,08	16,06	
2b	7,2534	— 17,3	18,7	12,33	„ „ 32
	6,2178	— 17,1	17,92	12,69	
2c	3,4940	— 17,55	18,7	12,33	„ „ 32
	3,8144	— 15,9	17,2	14,90	
2d	6,0135	— 17,15	17,45	12,25	„ „ 32
	6,6538	— 17,8	16,93	11,35	
3a	4,0333	— 20,3	21,93	18,87	„ „ 39
	3,6658	— 21,2	21,46	18,70	
3b	6,5634	— 21,0	18,61	12,70	„ „ 39
	7,2008	— 20,0	18,56	12,10	
3c	3,6080	— 20,2	20,95	18,98	„ „ 39
3d	5,2490	— 21,4	19,11	15,3	„ „ 39

Protokolle zu Versuch 4 und 5.

Versuch	Angewandte Menge	T_0	T	T_1	
4a	3,2874	— 21,5	19,75	16,35	Protok. Nr. 40
	2,8538	— 21,1	18,95	15,9	
4b	3,1948	— 20,9	18,35	15,11	„ „ 40
	2,7576	— 21,1	16,93	14,18	
4c	2,8363	— 20,9	19,19	16,26	„ „ 40
	3,7308	— 20,9	18,0	14,33	
4d	3,6892	— 21,1	18,15	14,67	„ „ 40
	3,3902	— 21,3	18,50	15,20	
5a	5,3036	— 19,6	17,64	12,02	„ „ 27
	6,0957	— 19,45	18,19	11,76	
5b	5,1549	— 19,1	18,90	13,20	„ „ 31
	2,8327	— 18,4	19,66	16,40	

Protokolle zu Versuch 6 bis 13.

Versuch	Angewandte Menge	T_0	T	T_1	Freies Wasser	
6	5,3092	— 21,0	21,04	15,7	60,1	Protok. Nr. 38
	5,4798	— 20,4	19,39	14,09	58,2	
	5,1457	— 20,0	18,89	13,95	59,2	
7	2,1242	— 20,9	17,4	15,3	61,9	„ „ 44
	2,4904	— 21,4	17,0	14,6	59,8	
	2,3532	— 21,1	17,53	15,26	59,6	
8	3,5791	— 21,3	20,6	17,09	58,7	„ „ 43
	3,7164	— 20,6	21,01	17,35	59,3	
	3,3582	— 20,5	20,3	16,96	61,1	
9	2,7830	— 21,6	20,02	17,31	59,4	„ „ 41
	2,9124	— 21,0	19,53	16,79	56,8	
	2,5758	— 20,8	19,19	16,71	59,4	
10	4,0176	— 21,5	18,01	14,50	54,0	„ „ 37
	3,8570	— 21,5	17,99	14,59	55,0	
	3,8300	— 21,5	18,45	15,02	56,4	
11	3,8708	— 20,5	18,94	15,38	62,4	„ „ 42
	4,6317	— 21,1	19,13	14,50	65,0	
	3,7530	— 20,9	17,84	14,22	61,4	
12	3,5185	— 18,6	23,83	20,31	61,8	„ „ 26
	3,6745	— 17,2	23,5	19,91	60,9	
	3,3469	— 18,3	23,49	20,15	61,8	
13	5,5558	— 16,6	21,1	16,0	58,9	„ „ 20
	3,1457	— 17,15	21,02	18,03	59,4	

Protokolle zu Versuch 15 bis 17.

Versuch	Angewandte Menge	T_0	T	T_1	Freies Wasser	
15a	6,7640	— 17,98	21,19	14,78	61,5	Protok. Nr. 20
	3,1457	— 17,15	21,02	18,03	57,8	
	5,5588	— 16,60	21,10	16,0	57,3	
15b	5,8876	— 17,35	20,94	15,59	56,7	„ „ 20
	2,8536	— 18,6	20,25	17,60	54,0	
	6,1460	— 16,7	21,0	15,47	56,0	
16a	3,8708	— 20,5	18,94	15,38	62,4	„ „ 37
	4,6317	— 21,1	19,13	14,50	65,0	
	3,7530	— 20,9	17,84	14,22	61,4	
16b	3,9221	— 20,5	14,9	11,55	53,3	„ „ 37
	4,2014	— 20,7	17,4	13,78	50,6	
17a	4,0176	— 21,5	18,01	14,50	54,0	„ „ 41
	3,8570	— 21,5	17,99	14,59	55,0	
	3,8300	— 21,5	18,45	15,02	56,4	
17b	3,4443	— 20,4	18,39	15,32	56,4	„ „ 41
	4,0097	— 21,0	28,21	14,73	52,7	
	4,0045	— 21,1	17,80	14,25	54,9	

Protokolle zu Versuch 18.

Versuch	Angewandte Menge	T_0	T	T_1	Freies Wasser	
18a	2,7830	— 21,6	20,02	17,31	59,4	Protok. Nr. 42
	2,9124	— 21,0	19,53	16,79	56,8	
	2,5758	— 20,8	19,19	16,77	59,4	
18b	2,8238	— 20,3	17,45	14,91	55,7	„ „ 42
	3,1762	— 21,4	17,09	14,20	56,8	
18c	3,3732	— 21,5	16,95	13,90	55,9	„ „ 42
	2,8965	— 20,8	18,11	15,47	54,8	
	2,9654	— 20,5	17,81	15,19	52,2	

Zur Frage nach der Bedeutung der Muskelhormone im Sekretionsprozesse der Verdauungsdrüsen.

Von

R. Krimberg.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Riga.)

(Eingegangen am 30. Januar 1925.)

Es ist uns schon seit längerer Zeit bekannt, daß unter den chemischen Sekretionserregern des Magensaftes an erster Stelle die Extraktivstoffe des Fleisches genannt werden müssen. Trotzdem war es aber bis vor kurzem nicht gelungen, auch nur einen der aktiven Stoffe aus dem komplizierten Gemisch des Fleischextrakts zu isolieren. Besonders viel Aufmerksamkeit war in dieser Hinsicht natürlich dem Kreatin bzw. dem Kreatinin geschenkt worden, jedoch die erhaltenen tatsächlichen Befunde waren durchweg negative.

Neuerdings sind diese beiden Stoffe auch im hiesigen Laboratorium von meinem Mitarbeiter *Komarow*[1]) speziell auf ihre eventuelle Fähigkeit, die Darmsekretion zu bewirken, geprüft worden. Es ergab sich dabei aber, daß weder das Kreatin noch das Kreatinin in Gaben bis zu 1 g einem Hunde mit *Thiry-Vella*scher Darmfistel direkt in den Blutkreislauf eingeführt, irgendeinen bemerkbaren Einfluß auf die Darmdrüsen auszuüben imstande sind. Ebenso ohne jede sichtbare Wirkung blieb die Einverleibung dieser beiden Stoffe auch auf die Funktionen anderer Organe dieses Hundes, soweit man über dieselben sozusagen klinisch urteilen konnte. Im Zusammenhange damit würde ich mir erlauben, darauf hinzuweisen, daß dem Kreatin und Kreatinin höchstwahrscheinlich nur insoweit eine spezielle Bedeutung im Stoffwechsel zukommt, als dieselben möglicherweise die einzige wichtigste Vorstufe zur Bildung der methylierten Guanidine darstellen[2]). Diese letzteren aber sind bekanntlich in hohem Grade aktiv und müssen meiner Ansicht nach als sehr wichtige Hormone des Organismus und speziell des Muskelgewebes betrachtet werden.

Nachdem es nun aber in neuerer Zeit gelungen war, besonders durch die Arbeiten von *Gulewitsch*, *Krimberg* und *Kutscher*, zuerst aus dem *Liebig*schen Fleischextrakt mehrere neue Bestandteile desselben

[1]) *S. A. Komarow*, diese Zeitschr. **147**, 251, 1924.
[2]) *R. Krimberg*, Die Hormone usw., S. 60. Charkow 1918.

zu isolieren und die chemische Natur derjenigen von den neuen Körpern, welche vorher nicht bekannt gewesen waren, wenigstens in den Hauptzügen festzustellen, und nachdem ich bald darauf gezeigt hatte, daß das Carnosin, Carnitin und Methylguanidin auch in ganz frischen Muskeln als deren präformierte Bestandteile enthalten sind[1]), schien mir natürlich auch der Wunsch durchaus gerechtfertigt zu sein, diese neuen stickstoffhaltigen organischen Basen auf ihre etwaige physiologische Aktivität und speziell auf ihre eventuellen excitosekretorischen Eigenschaften zu prüfen. Die diesbezüglichen Versuche, welche schon in meinem Charkower Laboratorium im Jahre 1910 angefangen worden waren, zeigten bald, daß das Carnitin, Hunden intravenös oder auch subkutan eingeführt, eine deutliche, das Methylguanidin aber eine ganz besonders starke physiologische Aktivität entfaltet, und daß diese beiden Stoffe unter anderem nicht nur auf die Magendrüsen allein, sondern mehr oder weniger auch auf die übrigen Verdauungsdrüsen einen excitosekretorischen Einfluß ausüben.

In der letzten Zeit sind auch im hiesigen Laboratorium neue Beweise für die hochgradige physiologische Aktivität des Methylguanidins im allgemeinen und speziell in bezug nicht nur der Darmdrüsen-, sondern gelegentlich auch der Magensaft-, Speichel- und Gallenabsonderung geliefert worden[2]).

Über die physiologische Aktivität des Carnosins und der sogenannten Carnosinfraktion des Fleischextraktes.

Was nun weiter das Carnosin anbelangt, so war ich noch vorher im Laboratorium von *Gulewitsch* auf den verhältnismäßig großen Gehalt des Fleischextraktes an dieser Base gestoßen, denn es war mir gelungen, bei der ersten Bearbeitung von 500 g *Liebigs* Extrakt bis über 20 g Carnosinnitrat, und später aus 4,5 kg Muskelfleisch eines soeben getöteten Stieres über 7,4 g desselben Salzes, was, auf die freie Base umgerechnet und auf die frischen Muskeln bezogen, etwa 1,3 Prom. Carnosin ausmacht, zu isolieren[3]). Es muß hierzu noch bemerkt werden, daß die von mir in beiden Fällen angewandte Methode keine quantitative Bestimmung des Carnosins zum Ziele hatte, und daß ein gewisser Teil der Base in den letzten Mutterlaugen verblieb und nicht auskristallisierte. In der Überzeugung, daß eine Substanz, welche in so großer Menge wie das Carnosin im Organismus vorkommt, gleich dem Kreatin und Kreatinin physiologisch durchaus inaktiv sein müßte, wurde eine größere Menge (etwa 0,9 g) der aus den Phosphorwolfram-

[1]) *R. Krimberg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **48**, 412, 1906.
[2]) *S. A. Komarow*, diese Zeitschr. **147**, 221—252, 1924.
[3]) *R. Krimberg*, Über die stickstoffhaltigen Extraktivstoffe der Muskeln, Inaugural-Dissertation, S. 177. Moskau 1907.

und Silberbarytniederschlägen nach der Methode von *Gulewitsch* und *Krimberg*[1]) erhaltenen, mit Salzsäure neutralisierten Carnosinfraktion des *Liebig*schen Fleischextraktes in Wasser gelöst und einem mittelgroßen Hunde, welchem ein Magenblindsack nach *Heidenhain-Pawlow* angelegt worden war, direkt in die Vena jugularis eingeführt.

Gegen alle Erwartung war die Reaktion seitens des Organismus eine sehr heftige, geradezu stürmische, so daß man sogar um das Leben des vorher vollständig gesunden Tieres ernstlich besorgt sein mußte. Das akute Vergiftungsbild dauerte etwa 20 Minuten und trat gleich nach der Einspritzung auf, wobei von den sichtbaren Symptomen große Unruhe, starkes Erbrechen (teilweise mit Galle), heftige, dünnflüssige, farblose Durchfälle (dreimal), Speichelfluß, Harnentleerung und Dyspnoe hervorgehoben werden können. Aber erst nach einer halben Stunde, als sich das Tier schon ziemlich beruhigt hatte, zeigte sich der erste salzsäurehaltige Tropfen des Magensekrets. Die Sekretion nahm allmählich zu und war nach 6 Stunden, wo die Beobachtung unterbrochen werden mußte, noch nicht beendet. Während der Beobachtungszeit wurden 5,4 ccm aktiven Sekrets aus dem Magenblindsack gesammelt. Als nun aber später viel kleinere Mengen der Carnosinfraktion demselben Hunde einverleibt wurden, blieben die heftigeren Vergiftungssymptome zwar aus, und das Tier verhielt sich bedeutend ruhiger, die Absonderung des Magensaftes war jedoch auch dann stets eine beträchtliche. In einem Versuch z. B. erhielt der Hund etwa 0,18 g von der Carnosinfraktion intravenös, wonach aber während einer Zeitdauer von 2 Stunden aus dem Magenblindsack 3,5 ccm Saft abgeschieden wurden (Gesamtacidität = 112, Salzsäure = 0,33 Proz., Pepsin = 320 nach *Fuld*). Schließlich, die Einführung von nur etwa 0,09 g der Carnosinfraktion ins Blut rief zwar keine merkbaren Vergiftungssymptome mehr hervor, die Sekretion begann jedoch, ebenso wie in dem vorhergehenden Versuch, schon nach etwa 3 Minuten, und die Menge des aus dem Blindsack erhaltenen Magensaftes betrug nach einer etwa $2\frac{3}{4}$stündigen Dauer des Versuchs 1,85 ccm (Gesamtacidität = 94, Salzsäure = 75, Pepsin = 160 nach *Fuld*).

Wie schon erwähnt, war in den soeben angeführten Versuchen eine Carnosinfraktion in toto angewandt worden in der Voraussetzung, daß, falls in dieser Fraktion eine excitosekretorisch wirkende Substanz überhaupt vorhanden sein sollte, so müßte dieselbe eben das Carnosin sein. Durch weitere Versuche hat es sich nun jedoch erwiesen, daß das reine Carnosin zwar ohne jeden Zweifel die Fähigkeit besitzt, die Verdauungsdrüsen bei intravenöser Applikation excitosekretorisch zu

[1]) *R. Krimberg*, Hoppe-Seyler-Tierfelders Handb. d. physiol.-chem. Analyse 1909, S. 758.

beeinflussen, daß seine „Giftigkeit" aber sogar nach größeren Gaben eine viel zu geringe ist, um ein so heftiges Vergiftungsbild wie das nach der Einverleibung der Carnosinfraktion in toto zu beobachtende, hervorrufen zu können.

Eine neulich von *Komarow*[1]) publizierte Arbeit zeigt ohne weiteres, daß im Carnosin der Organismus einen sehr wirksamen Funktionserreger des weit ausgebreiteten Darmdrüsenapparats besitzt, so daß, wenn man die minimalen, auf die Darmdrüsen eben noch wirksamen Mengen dieser Substanz mit ihrem Gesamtgehalt im Organismus vergleicht, das gefundene Verhältnis in denselben Grenzen, in welchen z. B. das Adrenalin die ihm eigentümliche Wirkung auf den Blutdruck auszulösen noch imstande ist, liegt. Diese Funktionserregung des Darmes durch das Carnosin äußert sich nicht nur in der Verstärkung der Darmsaftsekretion allein, sondern auch in einer Steigerung der Motilität des Darmes. Nach Einverleibung des Carnosins wurde stets häufiges Knurren in den Gedärmen, sowie lebhafte Bewegungen der in die Haut eingenähten Darmteile, seltener aber auch Stuhldrang und Stuhlabgang wahrgenommen.

Daß das reine Carnosin nach intravenöser Injektion nicht nur auf die Darmdrüsen allein, sondern auch auf die Magendrüsen safttreibend einwirkt, ist eine in unserem Laboratorium mehrfach konstatierte Tatsache. Nehmen wir nur die erst vor kurzem gemachten Beobachtungen in Betracht, so verweise ich zuerst auf die Versuche 10, 11 und 12 in der soeben erwähnten Arbeit von *Komarow*, in welchen neben der Menge des Darmsaftes gleichzeitig auch die Menge des aus der Magenfistel abgeschiedenen Sekrets notiert wurde, und dann auf die zwei in dieser Arbeit angeführten Versuchsprotokolle. In diesen letzteren Versuchen wurde ein aus Hundemuskeln rein dargestelltes Carnosinpräparat als Chlorid einem 7 1/2 kg wiegenden Hunde mit einfacher Magenfistel und durchgeschnittenem Oesophagus intravenös eingeführt.

Aus den soeben in Betracht gezogenen Versuchen sieht man deutlich, daß die Fähigkeit des Carnosins, auf die Magendrüsen erregend einzuwirken, wohl keineswegs in Abrede gestellt werden kann. Es muß jedoch aber auch eingestanden werden, daß, während in einigen von diesen Versuchen die Menge des abgeschiedenen Magensaftes eine recht bedeutende ist, dieselbe in den anderen Versuchen dagegen als eine ziemlich geringe angesehen werden muß, obwohl die einverleibten Carnosingaben, auf 1 kg Körpergewicht berechnet, nur wenig voneinander abwichen (etwa 0,03 bis 0,043 g pro 1 kg), und obwohl man auf die Ausschaltung aller eventuellen psychischen Einflüsse während der Versuche natürlich stets aufs sorgfältigste bedacht war. Zur Aufklärung dieser beobachteten Diskrepanz in den unter dem Carnosineinfluß zu erhaltenden Mengen des Magensekrets sind weitere Versuche im Gange.

---

[1]) *S. A. Komarow*, diese Zeitschr. **151**, 467, 1924.

Versuch 1.

Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 5 Uhr nachmittags.

Zeit	Magensaft: Menge ccm	Magensaft: Gesamtacidität	Magensaft: HCl	Puls	Bemerkungen
4h30'	—	—	—		Beginn der Beobachtung
4 58	4,0 hauptsächl. Schleim		sehr schwach positiv auf Kongo		
4 58—59'					*Injektion 0,35 g Carnosin* (mit HCl neutralisiert, 5proz. Lösung, intravenös)
5 02'				95	
5 04	Schleim			95	
5 30	7,0			105—110	
6 00	3,0	53	32	95	Ruhig; schlummert größtenteils während des Versuchs
6 30	13,0			95	
7 00	13,0	104	84	95	
7 30	5,0			95	
8 00	4,0 hauptsächl. Schleim	84	58	95	

Versuch 2.

Letzte Fütterung am vorhergehenden Tage um 5 Uhr nachmittags.

Zeit	Magensaft: Menge ccm	Magensaft: Gesamtacidität	Magensaft: HCl	Puls	Bemerkungen
3h30'				Während des ganzen Versuchs 75—70	Beginn der Beobachtung
4 00	3,0 Schleim	92	66		
4 10					*Injektion 0,35 g Carnosin* (mit HCl neutralisiert, 5proz. Lösung, intravenös)
4 40	13,0	102	84		
5 10	3,0				
5 40	10,0	164	74		Ruhig; schlummert fast die ganze Zeit
6 10	7,0				
6 40	4,0	102	84		
7 10	14,0				
7 40	33,0	142	72		Winselt ohne Grund; beleckt sich und schluckt sehr oft
8 10	42,0				
8 40	10,0	136	119		
9 10	2,0 Schleim				

Obwohl das Carnosin also auf Grund der zurzeit vorliegenden Untersuchungen als ein sehr wirksamer Funktionserreger des Darmdrüsenapparats und als ein augenscheinlich weniger wirksamer Erreger der Magendrüsen betrachtet werden muß, so ist doch seine Allgemeinwirkung auf den Organismus als eine zwar sehr deutliche, aber im ganzen jedoch als eine ziemlich milde zu bezeichnen, denn außer der von uns schon früher konstatierten Blutdrucksenkung[1]) kann bei

[1]) *R. Krimberg*, Die Hormone usw., S. 72—73. Charkow 1918.

Hunden nach Carnosingaben, größer als 0,03 g pro 1 kg Körpergewicht, fast immer nur noch eine mäßige Pulsbeschleunigung (z. B. von 130 vor bis 170 nach der Injektion) beobachtet werden. *Das Carnosin ist also unzweifelhaft physiologisch aktiv*, und wenn es im Blute als dessen normaler Bestandteil zirkuliert, woran wir ebenfalls nicht zweifeln, so kann es wohl mit vollem Rechte zur Kategorie der Hormone hinzugezählt werden.

In einer neulich von *C. Schwarz*[1]) publizierten Arbeit über die physiologische Wirkung des Carnosins lesen wir zum Schluß: „Fassen wir das Ergebnis dieser Untersuchungen zusammen, so ergibt sich zunächst, daß das Carnosin auf die Drüsensekretion vollständig wirkungslos ist, daß wir in ihm also nicht jenen unter den Extraktivstoffen des Muskels zu erblicken haben, welcher die Magensaftsekretion auszulösen imstande ist". Ich würde mir jedoch erlauben, diesen kategorischen Abschluß der Frage nach den excitosekretorischen Fähigkeiten des Carnosins als eine zum mindesten sehr unvorsichtige wissenschaftliche Tat zu bezeichnen. Es ist ja aus dem soeben zitierten Satz vollständig klar, daß der negative Schluß des Verfassers sich auch auf die Darmdrüsen bezieht, obwohl, wie aus seiner Arbeit ebenfalls zu ersehen ist, die Einwirkung des Carnosins auf dieselben von ihm überhaupt gar nicht untersucht worden ist. Und wie schon oben gesagt, gerade die weitverbreiteten Drüsen des Darmes sind aber diejenigen, auf welche das Carnosin excitosekretorisch am stärksten wirksam zu sein scheint. Was nun weiter die von *C. Schwarz* angewandte Untersuchungsmethode anbelangt, so kann meiner Ansicht nach sehr stark bezweifelt werden, ob dieselbe für den gegebenen Zweck überhaupt die richtige ist. Bei seinen Untersuchungen über die Wirkung des Carnosins auf die Drüsensekretion hat *C. Schwarz* dasselbe nur einmal in einem akuten Versuch an einer Katze intravenös appliziert und dabei gefunden, daß es auf die Speichelabsonderung aus der Gl. submaxillaris ohne Wirkung ist. In allen übrigen an Hunden mit permanenten Fisteln ausgeführten Versuchen dagegen ist lediglich nur eine Benetzung der Schleimhaut der betreffenden Teile des Verdauungstraktus mit 1proz. Carnosinnitratlösung angewandt worden. Mich an die zuerst von *A. Bickel*[2]) ausgesprochene Meinung anschließend, bin ich nun der Ansicht, daß die Extraktivstoffe der Fleischnahrung nicht, wie man früher allgemein annahm, von der Magenschleimhaut aus, sondern hauptsächlich nach der Resorption auf humoralem Wege die Magendrüsen beeinflussen[3]). Betrachten wir nun aber noch dazu das Carnosin als einen in den Muskeln gebildeten Inkretstoff, welcher an den physiologischen Sekretionen im Verdauungstraktus beteiligt ist, so wird die Zweckmäßigkeit seiner Einführung direkt ins Blut bei den diesbezüglichen Versuchen ohne weiteres klar. Die von *C. Schwarz* mit Hilfe der Benetzungsmethode erhaltenen negativen Resultate können jedoch allerdings als wertvolle Stütze gerade für den humoralen Einwirkungsmodus des Carnosins auf die Verdauungsdrüsen angesehen werden.

---

[1]) *Carl Schwarz*, Pflügers Arch. **202**, 435, 1924.

[2]) *A. Bickel*, Mechanismus der Magensaftsekretion. Handb. d. Biochem. Herausgegeben von C. Oppenheimer. Ergänzungsband **1913**, S. 397.

[3]) *R. Krimberg*, Zur Frage nach dem Sekretionsmechanismus der Magendrüsen, S. 5—22. Charkow 1915.

Vergleichen wir nun schließlich die Wirkung des reinen Carnosins auf den Organismus mit der oben kurz geschilderten Wirkung der Carnosinfraktion des Fleischextraktes in toto auf denselben, so wird es uns sofort einleuchten, daß durch die physiologische Aktivität des Carnosins allein die scharf ausgeprägten Vergiftungssymptome, welche nach Einverleibung größerer Mengen der Carnosinfraktion stets beobachtet werden, auf keinen Fall zu erklären sind. Man müßte natürlich zuerst an das in hohem Grade wirksame Methylguanidin und vielleicht auch noch an das Dimethylguanidin denken, welche eventuell zum Teil in der Carnosinfraktion enthalten sein könnten, aber es muß auf jeden Fall auch damit gerechnet werden, daß in der Carnosinfraktion noch irgendwelche andere, vorläufig unbekannte, stark „giftige" Hormone vorhanden sind.

In unseren Versuchen haben wir, wie schon erwähnt, eine aus dem *Liebig*schen Fleischextrakt gewonnene Carnosinfraktion verwandt. Wie jedoch zu erwarten war, sprechen einige Beobachtungen dafür, daß der im Laboratorium aus ganz frischen Muskeln dargestellte Extrakt, nach derselben Methode wie der *Liebig*sche Extrakt bearbeitet, ebenfalls eine auf die Magendrüsen stark wirksame Carnosinfraktion liefert. Um die physiologische Aktivität der aus dem *Liebig*schen Fleischextrakt und der aus frischem Muskelextrakt erhaltenen Carnosinfraktion näher und vergleichend zu studieren, sind von uns weitere Versuche in Angriff genommen worden.

Zur Theorie des Sekretionsmechanismus der Verdauungsdrüsen.

Betrachten wir den jetzigen Stand der Lehre von dem Sekretionsmechanismus der Verdauungsdrüsen, so finden wir sofort, daß die sekretorische Arbeit derselben als die Folge einer unmittelbaren und direkten Einwirkung zweier, ihrer Natur nach total verschiedener Erreger auf die Drüsenzelle angesehen wird. Als die nächsten und auf die Drüsenzelle direkt wirksamen Erreger werden unter physiologischen Bedingungen, wie bekannt, der sekretorische Nerv und die im Blute zirkulierende chemische Substanz angegeben, wobei dem ersteren augenblicklich allerdings ein viel umfangreicheres Einwirkungsgebiet und eine überhaupt viel größere Bedeutung in den Sekretionsprozessen zuerkannt wird. Diese beiden Erreger, heißt es nun weiter, sollen ihren Einfluß auf die Drüsenzelle stets ganz unabhängig voneinander ausüben, so daß, wenn z. B. das Hormon tätig ist, der sekretorische Nerv dabei überhaupt keine Rolle mitspielt — und umgekehrt. Dessenungeachtet können sie aber augenscheinlich auch beide gleichzeitig auf ein und dieselbe Drüsenzelle einwirken, wie ja wohl

am besten aus dem jetzigen Stande unserer Vorstellungen über die sekretorische Tätigkeit der Bauchspeicheldrüse bei normaler Nahrungsaufnahme gefolgert werden darf.

Es scheint mir jedoch schon a priori sehr unwahrscheinlich, erstens, daß unter physiologischen Bedingungen die spezifische Tätigkeit eines Endorgans durch die direkte und unmittelbare Einwirkung zweier ihrer Natur nach gänzlich verschiedener Erreger hervorgerufen werden könnte, und zweitens, daß unter denselben Bedingungen die Wirkung des Hormons von jedem Nerveneinfluß frei wäre, denn die diesbezüglichen Versuche mit Atropin beweisen ja nur eigentlich, daß das Hormon unter Umständen auch bei ausgeschalteten sekretorischen Nervenelementen auf die Drüsenzelle erregend einwirken kann, aber damit ist meines Erachtens durchaus noch kein Beweis geliefert, daß die Nervenelemente auch bei normalen physiologischen Verhältnissen an der excitosekretorischen Wirkung des Hormons tatsächlich keinen Anteil nehmen. Es scheint mir vielmehr, daß die Drüsenzelle überall nur durch eine Art der in Frage kommenden Erreger, nämlich durch die chemische Substanz erregt werden müßte, daß die sekretorischen Hormone aber unter normalen physiologischen Verhältnissen ihren erregenden Einfluß auf die Drüsenzelle überall und stets nur unter regulatorischer Mitwirkung des Nervensystems ausüben könnten.

Die in Verfassers Laboratorium ausgeführten und im vorhergehenden schon erwähnten Untersuchungen hatten also gezeigt, daß im Phosphorwolframsäureniederschlag des Fleischextraktes in größerer Menge mehrere Stoffe enthalten sind, welche alle Eigenschaften der Hormone besitzen, und welche, in den Blutkreislauf oder auch subkutan eingeführt, unter anderem einen sekretorischen Reiz auf die Verdauungsdrüsen auszuüben imstande sind. Da nun diese Stoffe sicher auch im Blute zirkulieren, und einige von denselben sind ja auch schon tatsächlich darin sowie in den Ausscheidungen von mehreren Autoren aufgefunden worden, und da die sekretionserregende Wirkung des Fleischextraktes, obwohl hauptsächlich nur für die Magendrüsen, bereits schon früher bekannt war, so lag natürlich die Vermutung nahe, daß in dem weitverbreiteten Muskelsystem excitosekretorische Hormone in erheblicher Menge produziert, aufgespeichert und allmählich in den Blutkreislauf abgegeben werden, und daß man dieselben möglicherweise auch unter physiologischen Bedingungen als die wichtigsten und vielleicht sogar als die einzigen direkten Erreger der Verdauungsdrüsen betrachten könnte. Diese in den Muskeln als deren Stoffwechselprodukte entstehenden Sekretionserreger könnten in ihrer Wirkung selbstverständlich auch noch von ähnlichen anderen, aus den übrigen Organen und Drüsen des Körpers, und zum Teil sogar aus der Nahrung

stammenden Stoffen, je nach Umständen mehr oder weniger unterstützt werden.

Wenn wir die große Menge der im Muskelsystem enthaltenen und zum Teil sehr scharf ausgeprägte excitosekretorische Eigenschaften aufweisenden Substanzen in Betracht ziehen, so läßt sich der intimere Mechanismus der Drüsenarbeit auf Grund der soeben angeführten Tatsachen und Erwägungen, sowie auf Grund der Sekretionserscheinungen nach Durchtrennung der zu den Drüsen verlaufenden Nerven, und endlich, unter Heranziehung des Phänomens der periodischen Sekretion, auf die folgende Weise vorstellen.

Der Mechanismus, durch welchen die Drüsenarbeit nach Einführung einer sekretionserregenden Substanz direkt ins Blut oder subkutan zustande kommt, ist meines Erachtens demjenigen der periodischen Sekretion vollständig analog. Diese letztere, allerdings höchst merkwürdige physiologische Erscheinung läßt sich aber meiner Ansicht nach unter Heranziehung der im Blute stets vorhandenen Hormone ungezwungen und sehr einfach erklären.

Ich möchte hier vorher bemerken, daß die zuerst von *W. Boldyreff*[1]) beschriebene periodische Tätigkeit der Verdauungsdrüsen auch im hiesigen Laboratorium sorgfältigst nachgeprüft worden ist und als eine tatsächlich existierende absolut sicher betrachtet werden darf[2]).

Im nüchternen Zustande des Tieres, d. h. bei leerem Magen und völliger Ruhe der Magendrüsen, unterliegt die im Blute enthaltene, im ganzen nur geringe Menge der sekretorischen Hormone gewissen periodischen Schwankungen, weil hauptsächlich aus den Muskeln und zum Teil auch aus den übrigen Organen fortwährend und ceteris paribus in einem sehr gleichmäßigen Tempo neue, obwohl ebenfalls nur sehr geringe Mengen derselben ins Blut abgegeben werden. Ist nun die oberste, dem betreffenden Organismus naturgemäß gestattete Konzentrationsgrenze dieser Stoffe im Blute erreicht, so muß der Überschuß eliminiert werden, besonders weil es unter ihnen auch Substanzen gibt, die in höheren Konzentrationen sich als physiologisch durchaus nicht harmlos erwiesen haben. Die Abscheidung aus dem Blute wird dadurch eingeleitet, daß diese nicht seltenen also sehr aktiven Substanzen auf bestimmte Nervenzentren erregend einwirken. Dank dem erregten Zustande der Drüsennerven wird nun den sekretorischen Hormonen selbst, und augenscheinlich auch den erhöhten Mengen aller anderen zur Produktion des Sekrets notwendigen Stoffe ein freier Eintritt aus dem Blute in die Drüsenzelle ermöglicht. In der letzteren

[1]) *W. N. Boldyreff*, Die periodische Tätigkeit des Organismus usw. Russki Wratsch Nr. 45—49, 1914.
[2]) *S. A. Komarow*, diese Zeitschr. **146**, 130, 1924

entfalten die Hormone ihre excitosekretorische Wirkung und erscheinen schließlich als Bestandteile der Sekrete[1]).

Nach einer 20 bis 30 Minuten andauernden „Tätigkeitsperiode", während welcher aus einer Reihe anderer Erscheinungen die Absonderung von Pankreassaft, Darmsaft und Galle hervorzuheben ist, folgt beim Hunde eine 1½ bis 2½ Stunden lange „Ruheperiode", um nach Ablauf dieser Zeit von einer neuen Tätigkeitsperiode abgelöst zu werden. Die Perioden wechseln bei ein und demselben Tiere mit großer Regelmäßigkeit, so daß es möglich ist, falls man vorher einige wenige derselben beobachtet hat, die Anfangszeit der darauf folgenden im voraus ziemlich genau zu bestimmen. Es muß betont werden, daß die dabei abgeschiedenen „periodischen" Säfte durchaus vollwertige Säfte sind, weil in denselben gewöhnlich die für das betreffende Tier als maximal geltende Fermentmenge gefunden wird.

Es liegt die Vermutung nahe, daß wohl alle im Blute kreisenden Hormone, insofern als dieselben nicht weiter umgewandelt oder zerstört werden, auf die soeben beschriebene Weise durch die Ausscheidungs- bzw. Verdauungsdrüsen aus dem Organismus entfernt werden. Ich möchte hier nur daran erinnern, daß der Ausscheidungsmechanismus der Kohlensäure, welche ja vielfach als das einfachste Hormon bezeichnet wird, im Grunde genommen dem soeben geschilderten vollständig analog ist.

Nach experimenteller Einführung einer sekretionserregenden Substanz direkt ins Blut oder subkutan wird die Sekretion also dadurch ausgelöst, daß dabei im Blute entweder ein dem Organismus fremder Stoff erscheint, oder, wenn es sich um einen normalen Bestandteil des Blutes handelt, seine Konzentration dabei über die für den gegebenen Organismus übliche Norm gesteigert wird. In beiden Fällen wird die eingeführte Substanz als ein Bestandteil der Sekrete aus dem Blute entfernt.

Es ist ja eine schon längst bekannte Tatsache, daß nicht nur mit der Absonderung von Harn und Schweiß, sondern auch mit der Sekretion der Verdauungssäfte eine *Exkretion* von Abfallstoffen und von den verschiedensten körperfremden Substanzen einhergeht. Ich möchte hier also nur noch hinzufügen, daß auch diejenigen körperfremden pharmakologischen Substanzen und „Drüsengifte", welche nach intravenöser oder subkutaner Einverleibung excitosekretorisch auf die Drüsen des Organismus einzuwirken imstande sind, den soeben geschilderten Wirkungsmechanismus im allgemeinen ebenfalls aufweisen und in den betreffenden Sekreten bzw. Exkreten stets enthalten sein müßten.

Hauptsächlich dadurch, daß die Hormone des Blutes nach Entfaltung ihrer excitosekretorischen Wirkung in den Drüsenzelleibern

[1]) *R. Krimberg*, Zur Frage nach dem Sekretionsmechanismus der Magendrüsen 1915; Die Hormone usw. 1918.

als Bestandteile der Sekrete erscheinen, erklärt sich meines Erachtens auch die wohlbekannte Fähigkeit einiger Sekrete und Exkrete, nach deren Wiedereinführung ins Blut oder subkutan von neuem Sekretionen hervorzurufen. Als das beste diesbezügliche Beispiel kann die Gallenabsonderung angeführt werden, bei welcher, wie man schon längst weiß, auch die Galle selbst eine nicht zu unterschätzende Rolle mitspielt. Es ist nämlich gezeigt worden, daß die in den Darm ausgeschiedenen Gallensäuren zum großen Teil resorbiert werden, wonach sie von neuem auf die Leberzellen excitosekretorisch einwirken können, um mit der Galle abermals in den Darm zurückzugelangen, usw. Dieser sogenannte „Kreislauf der Galle“ erscheint somit als eine während der Verdauungsperiode höchst zweckmäßige Einrichtung, wodurch genügende frische Mengen der an den Verdauungs- und Resorptionsprozessen in so mannigfacher Weise beteiligten Galle ununterbrochen und sicher herbeigeschafft werden können. Aus diesem Grunde müßte auch die Gallensäure also, und allerdings nicht mit weniger Recht als die Kohlensäure, ebenfalls zur Gruppe der Hormone hinzugerechnet werden.

Wie oben angegeben, basiert die hier vertretene Ansicht über den Wirkungsmodus der sekretorischen Hormone zum Teil auf der Annahme, daß das Nervensystem, welches an den Sekretionsprozessen ebenfalls stets beteiligt ist und dieselben sehr genau reguliert, in seinem Ruhezustande hemmenden Einfluß auf die Drüsenzellen ausübt in dem Sinne, daß es den Hormonen und, wie es scheint, auch den nur während der Sekretionsperiode notwendigen erhöhten Mengen anderer Stoffe den Eintritt aus dem Blute in die Drüsenzellen versperrt.

Es muß hier jedoch bemerkt werden, daß dieser hemmende Einfluß des Nervensystems sich augenscheinlich nicht auf alle Drüsen mit der gleichen Stärke geltend macht. Beim Hunde scheint derselbe im Fundus des Magens am stärksten ausgeprägt zu sein, weil in vollständig nüchternem Zustande des Tieres darin sehr oft auch nicht die geringste Sekretion beobachtet werden kann, während im Pylorus dagegen, wo angeblich eine geringe aber kontinuierliche Sekretion stattfinden soll, die Hemmungen also bedeutend schwächere sein müssen. Schwächer als im Fundus sind die hemmenden Einflüsse der Nerven auch in den Darmdrüsen und im Pankreas, wie dies ja aus den Beobachtungen über die periodische Sekretion gefolgert werden kann, bei welcher die Saftabsonderung im Magen gewöhnlich ganz ausbleibt, und besonders in der Leber und in den Speicheldrüsen, welche, wie bekannt, ebenfalls auf eine gewisse kontinuierliche Sekretabsonderung eingestellt sind.

Es gibt also Drüsen, welche auch außerhalb der Verdauungsperiode obwohl schwach, jedoch aber kontinuierlich sezernieren, was uns zu der Annahme zwingt, daß an der spezifischen Tätigkeit dieser Drüsen die excitosekretorischen Hormone des Blutes bald mehr bald weniger, aber jedenfalls ununterbrochen beteiligt sind. Was im Gegenteil diejenigen Drüsen anbelangt, welche in der Ruhe kein Sekret nach außen absondern, und als solche müssen hauptsächlich die Drüsen des Magenfundus angesehen werden, so kann die Beteiligung der Bluthormone an der spezifischen

Tätigkeit desselben im Ruhezustande nur eine verhältnismäßig sehr geringe sein. Die Produktion der Fermente sowie anderer Bestandteile der Sekrete werden in solchem Zustande von den hauptsächlich im Stoffwechsel der Drüsenzelle selbst gebildeten Hormonen, unter welchen die Kohlensäure und das Ammoniak besonders in statu nascendi eine wichtige Rolle spielen, angeregt und unterhalten. Die im Blute zirkulierenden Hormone dienen hauptsächlich also nur dazu, um bei erhöhten Anforderungen die spezifische Tätigkeit der Drüsenzelle bis zur jeweils nötigen Höhe zu verstärken, während im sogenannten Ruhezustande die Drüsenzelle qualitativ genau dieselbe Arbeit auch lediglich mit ihren eigenen Mitteln und Kräften zu verrichten imstande ist.

Wenn wir das gesamte, die Innervation der Verdauungsdrüsen betreffende experimentelle Material näher betrachten, so können wir als mit voller Sicherheit bewiesen, wohl nur die eine Tatsache anerkennen, nämlich, daß nicht nur in den parasympathischen allein, sondern auch in den sympathischen Nerven excitosekretorische Fasern zu den Verdauungsdrüsen verlaufen. Was dagegen die Existenz spezieller depressosekretorischer Nerven bzw. Nervenfasern anbelangt, Fasern, durch deren Reizung also spezielle Sekretionshemmungen ausgelöst werden sollen, so muß ausdrücklich betont werden, daß dieselbe bis jetzt wohl in keinem Falle einwandfrei bewiesen worden ist. Die diesbezüglichen experimentellen Befunde widersprechen sich oft und können nicht selten auch von ganz anderem Standpunkt aus erklärt werden[1]).

Die Frage nach dem Sekretionsmechanismus der Drüsen und speziell nach der Rolle der Nervenelemente in demselben kann aber sofort klar und, was von besonderer Wichtigkeit ist, für alle Drüsen auf die gleiche Art gelöst werden, wenn wir an die Stelle von den hypothetischen speziellen depressosekretorischen Nervenfasern die tatsächlich existierenden und hauptsächlich als Stoffwechselprodukte des weitverbreiteten Muskelsystems in beträchtlicher Menge entstehenden excitosekretorischen Hormone setzen. In solchem Falle aber muß die allgemein bekannte Fähigkeit der Drüsennerven nach ihrer Reizung Sekretionen auszulösen, lediglich dadurch erklärt werden, daß sie im Zustande der Erregung den im Blute zirkulierenden Hormonen, welche von diesem Standpunkte aus als die einzigen direkten Reizmittel des Organismus für die Drüsenzellen anzusehen sind, den Eintritt in dieselben notwendigermaßen frei machen, während sie im Zustande der Ruhe die Hormone daran mehr oder weniger stark verhindern, also depressosekretorisch einwirken.

Die allgemein bekannte, oft wochenlang andauernde spontane Sekretion der Drüsen nach Durchtrennung möglichst aller zu denselben

[1]) *R. Krimberg*, Zur Frage nach dem Sekretionsmechanismus der Magendrüsen, S. 38–40.

verlaufenden Nerven kann meines Erachtens nur so erklärt werden, daß durch diesen Eingriff der hemmende Einfluß des Nervensystems auf die Dauer abgeschafft wird. Der hemmende Einfluß des Nervensystems fällt aber ebenfalls weg bzw. wird mehr oder weniger geschwächt, sobald die Nerven in den Erregungszustand gebracht werden. Es ist dabei jedoch durchaus gleichgültig, ob der ausgeübte Reiz ein künstlicher, z. B. elektrischer, oder aber, was unter den normalen Verhältnissen von ganz besonderer Wichtigkeit erscheint, ein physiologisch-reflektorischer, von der Schleimhaut des Verdauungstraktus ausgehender ist, ob derselbe ein durch die hormonale Erregung der sekretorischen Nervenzentren oder gar ein psychoreflektorischer, in der Hirnrinde selbst durch Vorstellungen usw. entstandener ist.

Es ist also klar, daß nach dem hier vertretenen Standpunkt die Sekretion des sogenannten „psychischen" oder Appetitsaftes ebenfalls nur unter Mitwirkung der im Blute zirkulierenden und durch die betreffenden Drüsenzellen auf dem Wege zur Ausscheidung begriffenen Hormone ausgelöst werden kann. Da aber die Latenzperiode in diesem Falle eine verhältnismäßig sehr kurze ist und gewöhnlich nur einige wenige Minuten dauert, so muß daraus gefolgert werden, daß nicht nur während der Scheinfütterung, sondern auch bei normaler Nahrungsaufnahme die psychische Phase der Magensekretion, wenigstens im Anfang, wohl ausschließlich durch die Einwirkung der endogenen Hormone ausgelöst wird, während die aus dem Verdauungstraktus resorbierten Erreger natürlich erst bedeutend später und nur je nach der Art der eingeführten Nahrung mehr oder weniger unterstützend mitwirken können.

Der soeben in aller Kürze geschilderte Mechanismus gilt unserer Meinung nach nicht nur für die Arbeit der Verdauungsdrüsen allein, sondern er trifft im allgemeinen auch bei der Tätigkeit aller übrigen Ausscheidungsdrüsen, z. B. der Tränen- und Schweißdrüsen, sowie der Nieren zu, natürlich insofern die stattfindende Exkretion sich nicht durch einfache physikalisch-chemische Prozesse der Filtration, Osmose usw. erklären läßt.

Zum Schluß möchte ich noch darauf hinweisen, daß es sicherlich auch pathologische Zustände gibt, deren Hauptsymptome nur durch eine andauernde Überschwemmung des Blutes mit Hormonen bzw. Armut an denselben erklärt werden können. Im Zusammenhange damit werden wir natürlich im ersteren Falle eine auf die Dauer gesteigerte, im letzteren Falle dagegen eine im Verhältnis zur Norm verringerte Funktion der Verdauungs- und eventuell auch anderer Ausscheidungsdrüsen des Körpers zu erwarten haben. Als eines der besten Beispiele von Erkrankungen dieser Art können meiner Ansicht nach die zahlreichen Fälle des Hyper- bzw. Hypothyreoidismus gelten. Es liegt mir nämlich der Gedanke am nächsten, daß derjenige Inkretstoff, welcher den eigentlichen Grund für die hohe Bedeutung der Schilddrüse in erster Linie ausmacht, überhaupt kein

Hormon im wahren Sinne des Wortes ist, sondern eher wohl einen Aktivator (oder auch vielleicht ein Koferment) für die Enzyme des Zellplasmaeiweißes darstellt. Das assimilierte Eiweiß des Zellplasmas wird nun aber sicher auf eine ganz spezifische Weise abgebaut, und man kann leicht vermuten, daß nur bei diesem Abbau die für das betreffende Gewebe charakteristischen stickstoffhaltigen Hormone entstehen; daneben werden natürlich auch noch einige andere einfachere Hormone, wie z. B. die Kohlensäure und ganz besonders das Ammoniak, welches ja bei den Desaminierungsprozessen überall sowie auch bei der Verbrennung des Nahrungseiweißes frei wird, gebildet.

Als die Folge einer Überfunktion der Schilddrüse bekommen wir schließlich also eine erhöhte Hormonproduktion nicht nur in den Muskeln, sondern auch in allen übrigen Geweben und Organen des Körpers. Es werden dabei ohne Zweifel die verschiedenartigsten Hormone im Übermaß produziert, aber qualitativ sind es im großen und ganzen höchstwahrscheinlich nur dieselben Hormone, welche im gegebenen Organismus auch unter normalen Verhältnissen entstehen. Durch die lokale stimulierende Wirkung der im Übermaß gebildeten Hormone wird der Stoffwechsel in den Gewebszellen selbst mehr oder weniger in die Höhe getrieben, während eine Überschwemmung des Blutes mit denselben die verschiedensten Teile des Nervensystems, sowie auch viele andere Organe und Gewebe in einen dauernden Erregungszustand zu versetzen imstande ist. Um die Menge der im Blute zirkulierenden Hormone herabzusetzen, wird nun endlich der oben beschriebene Ausscheidungsmechanismus durch die Drüsen des Körpers in Gang gesetzt. Von den Drüsen des Verdauungstraktus werden hier vorwiegend natürlich dieselben, welche auch bei der periodischen Sekretion beteiligt sind, d. h. die Drüsen des Darmes, das Pankreas und die Leber in Anspruch genommen, und da die auf dem Wege durch die Darmwand zur Ausscheidung begriffenen Hormone gleichzeitig auch die Motilität des Darmes erhöhen, so kommt es dabei auch nicht selten zu den hartnäckigsten Diarrhöen.

In Fällen einer Hypofunktion der Schilddrüse dagegen muß die Menge der produzierbaren und im Blute enthaltenen Hormone natürlich eine geringere, als in der Norm sein, und infolgedessen ist das ganze resultierende Krankheitsbild geradezu das Gegenteil von dem, welches wir gewöhnlich beim Hyperthyreoidismus beobachten.

Untersuchungen über die Samenreifung.

Von

A. Blagowestschenski.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Kabinett der mittelasiatischen Staatsuniversität, Taschkent.)

(Eingegangen am 28. Januar 1925.)

Die Reifung der Samen ist bis jetzt noch äußerst wenig erforscht, und die ganze Literatur über diese Frage beschränkt sich auf eine verhältnismäßig kleine Anzahl von Arbeiten, welche der Umwandlung der einen oder der anderen einzelnen Gruppe chemischer Verbindungen gewidmet sind[1]). Dabei ist der Reifeprozeß sehr interessant, besonders da bei ihm die synthetischen Reaktionen, die im Zusammenhang mit der Speicherung der Reservestoffe zum Vorschein kommen, von großer Bedeutung sind. Eine detaillierte Untersuchung dieser Reaktionen hat besondere Bedeutung vom Standpunkt der Lehre von der Reversibilität der Fermentwirkung aus betrachtet. Dieser verhältnismäßig noch junge Zweig der Fermentologie stützt sich auf eine große Menge

---

[1]) **Asche.** *Arendt*, Landw. Versuchsstat. **1**, 50, 1860; *Amthor*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **6**, 227, 1882; *Partele*, Landw. Versuchsstat. **32**, 211, 1885; *André*, C. r. **139**, 805, 1904; *Wolff*, Aschenanalyse **1**, 27, 55, 117. — **Stickstoffverbindungen.** *Bummer* und *Kellermann*, Landw. Jahrb. 1876; *Emmerling*, Landw. Versuchsstat. **24**, 1880; **34**, 1887; **54**, 1900; *Hornberger*, ebendaselbst **31**, 1885; *Nedokutschajeff*, ebendaselbst **56**, 1902; **58**, 1904; Lswest. Mosk. Sc.-Ch. Inst. 1899 (russisch); Journ. Opt. Agron. **3**, 1902 (russisch); *N. J. Wassilieff*, Lsw. Kijew. Polytech. Inst. 1910; *W. Saliasskii*, Ber. d. bot. Ges. **23**, 1905; Beitr. z. bot. Centralbl. **1**, 27, 1911; *E. Schulze*, Landw. Jahrb. **35**, 1906; Zeitschr. f. physiol. Chem. **71**, 1911; *Schulze* und *Winterstein*, ebendaselbst **65**, 1910; *Pfenninger*, Ber. d. bot. Ges. **27**, 1909; *H. Lüers*, diese Zeitschr. **104**, 30—79, 1920. — **Kohlehydrate.** *Lucanus*, Landw. Versuchsstat. **4**, 1862; *Storer* und *Lewis*, Centralbl. Agrik.-Chem. 1879; *A. Müntz*, Ann. Sc. nat. (7), Bot. **3**, 1886; *Jessen-Hansen*, Centralbl. Agrik.-Chem. **26**, 1897; *Portele*, Landw. Versuchsstat. **32**, 1885; *Tanret*, C. r. **112**, 293, 1891. — **Fette.** *Meyer*, Neues System d. Pflanzenphysiol. **2**, 293, 1888; *Leclere du Sablon*, C. r. **123**, 1084, 1896; *S. Iwanoff*, Ber. d. bot. Ges. **29**, 1911; Beitr. z. bot. Centralbl. **28**, 1, 1912; *M. Korsakow*, C. r. **155**, 1162, 1912.

glänzender Experimente, bleibt aber bis jetzt fast ausschließlich auf chemischem Boden, ohne auf das Gebiet der Physiologie überzugehen. Über die synthetischen Prozesse in den Organismen und die sie regierenden Faktoren müssen wir immer noch nach Analogie mit dem, was in vitro oft in gänzlich künstlichen Bedingungen beobachtet wird, urteilen. Natürlich haben diese Analogien oft sehr vieles für sich und können ohne besondere Schwierigkeiten angenommen werden, direkte Beweise sind aber dennoch notwendig. Letztere können jedoch nur durch sorgfältige Untersuchung derjenigen Erscheinungen des Organismenlebens, in welchen die synthetische Wirkung über die zerstörende vorherrscht, geliefert werden. Die Bestimmungen der sich in der Zeit verändernden chemischen Zusammensetzung und die Feststellung der gesetzmäßigen Verhältnisse zwischen diesen Veränderungen und dem Vorhandensein entsprechender Fermente ist der richtigste Weg einer solchen Erforschung.

Im Pflanzenreiche offenbaren sich die synthetischen Prozesse am deutlichsten (ohne von der Kohlensäureassimilation durch die grünen Blätter zu sprechen) in den reifenden Samen, welche Vorräte von verschiedenen komplizierten Verbindungen (Eiweißstoffe, Stärke, Reservecellulose) auf Kosten der aus den Blättern zuströmenden einfachen Verbindungen bilden.

In dieser Arbeit sind an erster Stelle die Resultate einer quantitativen Untersuchung der Veränderung des Gehalts einiger Stoffe beim Reifen der Samen der Pferdebohnen (Vicia faba minor) dargestellt. Dabei beschränkte ich mich auf Verbindungen, die entweder den Charakter der Reservestoffe (Eiweiße, Stärke, Hemicellulose) oder der intermediären Verbindungen (Glucose, Saccharose, Aminosäuren) haben, und habe die anderen Stoffe, die im Pflanzenleben eine andere Rolle spielen, z. B. die zum Bestande der mechanischen Gewebe gehörenden, nicht untersucht. Nur für die Asche und den Ätherauszug waren vorläufige Bestimmungen getroffen.

Es wurden die Samen Vicia faba minor als Objekt der Untersuchung genommen, um die Aufgabe etwas zu vereinfachen, da die Samen Eiweiße und Kohlehydrate in ungefähr gleicher und Fette in einer ganz kleinen Menge enthalten. Die Samen waren im Botanischen Garten der Moskauer Universität gesät. In der zweiten Hälfte des Juli fing das einige Wochen dauernde reiche Blühen an. Das Reifen ging sehr langsam vor sich, und es gelang nicht, in den Verhältnissen des Moskauer Klimas reife Samen zu erhalten infolge der Mitte September eingetretenen Morgenfröste. Die gesammelten Samen wurden sofort von den Bohnenhülsen befreit, getrocknet und gewogen. Als Kriterium für das Gruppieren nach verschiedenen Reifestadien dienten die Erntezeit, das äußere Aussehen der Samen und, an erster Stelle, ihr Trocken-

gewicht. Offenbar infolge des ungleichen Saatmaterials und der verschiedenen meteorologischen Bedingungen der Jahre 1913 und 1914, in welchen ich Material für meine Untersuchungen bereitete, unterschieden sich die Samen der beiden Ernten voneinander, und die Resultate der Analysen einzelner Jahre können unmittelbar nicht verglichen werden.

Ernte des Jahres 1913.

Trockengewicht der 100 Samen des Saatmaterials war 42,5590 g.

Reifestadien:	I	II	III	IV	V
Trockengewicht von 100 Samen . . . . . . g	3,2280	10,4780	14,7010	36,9630	41,7820

Ernte des Jahres 1914.

Trockengewicht der 100 Samen des Saatmaterials war 53,4080 g.

Reifestadien:	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX
Trockengewicht von 100 Samen g	2,3235	3,9644	4,3609	9,6489	12,1720	14,7960	18,7020	23,5750	35,0550

Die Asche.

Eine Untersuchung des Aschegehalts wurde nur für die Ernte des Jahres 1913 gemacht und beschränkte sich auf die Bestimmung der gesamten Quantität der Rohasche. Die gewonnenen Resultate unterschieden sich nicht von dem, was von den anderen Verfassern gefunden war: Die relativen Mengen der Asche verringerten sich je nach dem Reifen, die absoluten stiegen. Bestimmungen einzelner Ascheelemente sind nicht ausgeführt worden.

Reifestadien:	I	II	III	IV	V
Asche in Proz. d. Trockengewichts	6,55	5,15	4,59	4,13	4,30
Asche in g auf 100 Samen	0,2199	0,5612	0,7561	1,6440	2,0270

Der Ätherauszug.

Für die in den Ätherauszug übergehenden Stoffe haben sich die Bestimmungen auch auf die Samen der Ernte des Jahres 1913 beschränkt, da sich ihre Mengen als sehr klein und zudem ungefähr gleich (im Verhältnis zum Trockengewicht der Samen) während der ganzen Reifezeit erwiesen. Eine Speicherung von Reservestoffen hatte hier folglich nicht stattgefunden, und fettähnliche Stoffe waren im gegebenen Falle den Samenzellen nicht als Nährmaterial nötig.

Reifestadien:	I	II	III	IV	V
Ätherauszug in Proz. .	1,23	1,12	1,15	1,21	1,35
„ in g auf 100 Samen	0,0113	0,1221	0,1809	0,4875	0,6219

Stickstoffhaltige Stoffe.

Durch die Untersuchungen *Wassilieffs* und *Saliesskiis* war festgestellt, daß je nach dem Fortschritt des Reifens die Mengen sowohl des gesamten als auch des Eiweißstickstoffs absolut und relativ wachsen, der Gehalt des nicht-proteinen Stickstoffs jedoch fällt. Allein eine genaue Untersuchung der Analysen von *Nedokutschajeff, Pfenniger, Schulze* und *Winterstein* zeigte, daß die in solcher kategorischen Form ausgesprochene Behauptung kaum richtig sei, da im Anfang des Reifens manchmal kein Anwachsen, sondern ein Fallen des Stickstoffgehalts stattfindet. Die Samen des Jahres 1913 untersuchend, stieß ich auf dieselbe Erscheinung.

Die relativen Quantitäten des gesamten Stickstoffs (nach *Kjeldahl* bestimmt) fallen, wie es in den Tabellen gezeigt, im Anfang der Reifezeit sogar stärker, als sie später wachsen. Die Veränderungen des Prozentgehalts des Eiweißstickstoffs (nach *Barnstein*) erwiesen sich in den ersten Stadien noch unregelmäßiger als die des gesamten. Die absoluten Mengen jedoch sowohl des einen als auch des anderen Stickstoffs, das Verhältnis des Eiweißstickstoffs zum gesamten und der Gehalt des nicht proteinen Stickstoffs veränderten sich ziemlich regelmäßig.

Reifestadien:	I	II	III	IV	V
Trockengew. v. 100 Samen	3,2280	10,4780	14,7010	36,9630	41,7820
Gesamt-N in Proz. des Trockengewichts . . .	6,90	6,76	5,21	5,75	5,86
Ges.-N in g auf 100 Samen	0,2227	0,7083	0,7661	2,1254	2,4482
Eiweiß-N in Proz. . . .	4,92	5,57	4,56	5,12	5,56
Eiweiß-N auf 100 Samen	0,1538	0,5836	0,6702	1,8926	2,3236
Nicht-Protein-N in Proz.	1,98	1,19	0,65	0,63	0,30
„ in g auf 100 Samen	0,0689	0,1247	0,0959	0,2328	0,1246
Eiweiß-N in Proz. von dem Gesamt-N . . .	71,33	82,40	87,49	89,20	94,91

Alle diese Umstände nötigten mich, im Jahre 1914 besondere Aufmerksamkeit auf die ersten Reifestadien zu lenken. Dabei erwies es sich, daß ganz im Anfang des zu erforschenden Prozesses der Stickstoffgehalt groß ist, dann fällt er und vergrößert sich schnell wieder. Darauf folgt ein langsames bedeutendes Fallen, das durch ein noch langsameres und schon nicht mehr großes Ansteigen abgelöst wird. Man bekommt den Eindruck von allmählich verlöschenden, wellenartigen Schwankungen. Das Gesagte bezieht sich sowohl auf den gesamten, als auch auf den Eiweißstickstoff. Der Grund der Erscheinung liegt, wie es scheint, in dem ungleichmäßigen Zufluß der stickstoffhaltigen und stickstofffreien Verbindungen aus den Blättern, wobei bald der eine, bald der andere Prozeß durch den benachbarten unterdrückt wird. Je nach dem Grade des Reifens der Samen wird der Unterschied im Zufluß weniger fühlbar und der Speicherungsprozeß der stickstoffhaltigen Stoffe regelmäßiger.

Reifestadien	Gesamt-N		Eiweiß-N		Nicht-Protein-N		Eiweiß-N in Proz. vom Gesamt-N
	Proz.	g in 100 Samen	Proz.	g in 100 Samen	Proz.	g in 100 Samen	
I	6,46	0,1512	3,42	0,0805	2,99	0,0707	53,72
II	5,74	0,2268	3,19	0,1265	2,55	0,1003	55,58
III	6,55	0,2856	4,04	0,1754	2,51	0,1102	61,77
IV	6,04	0,5828	4,07	0,3927	1,97	0,1901	67,43
V	5,02	0,6110	3,76	0,4570	1,26	0,1540	74,83
VI	4,87	0,7206	3,81	0,5637	1,06	0,1569	78,23
VII	5,04	0,9329	4,02	0,7441	1,02	0,1888	79,79
VIII	5,18	1,2213	4,21	0,9924	0,97	0,2289	81,28
IX	5,10	1,8895	4,41	1,6342	0,69	0,2553	86,38

Für stickstoffhaltige Verbindungen, die keinen Eiweißcharakter haben und durch die Differenz zwischen den Mengen des gesamten und des Eiweißstickstoffs bestimmt werden, wurden die Unregelmäßigkeiten, ebenso wie für die Ernten des Jahres 1913, in absoluten und nicht in relativen Größen beobachtet. Der Prozentgehalt des nicht Protein-stickstoffs fällt je nach dem Reifen sehr regelmäßig, seine Menge in 100 Samen jedoch wächst nicht ununterbrochen, sondern mit Momenten ganz gehörigen Fallens. Letztere sind offenbar durch die energische Synthese der Eiweißstoffe auf Kosten der früher in den Samen befindlichen Stickstoffverbindungen, d. h. verschiedener Aminosäuren und organischen Basen, bedingt.

Die löslichen reduzierenden Zucker und die Saccharose.

Beim Untersuchen des quantitativen Gehalts der löslichen reduzierenden Zucker (Glucose) wurden die Proben von feingepulverten Samen mit kochendem 70proz. Äthylalkohol ausgezogen. Nach der Destillation des letzteren im Vakuum bei 35 bis 40° wurde die Lösung mit Wasser bis zu einem gewissen Volumen gebracht und die Bestimmung der Glucose nach *Bertrand* ausgeführt. Zu einer besonderen Portion wurde die nach *O'Sullivans* und *Tompsons*[1]) Methode durch kontinuierliche (13 Monate) Selbstverdauung der Unterhefen in Anwesenheit des Toluols und Ausfällung des Ferments mit Alkohol zubereitete Invertase hinzugefügt. Die Inversion dauerte 24 Stunden bei 25°. Nach einer neuen Bestimmung des reduzierenden Zuckers wurde der Saccharosegehalt nach der Differenz zwischen der ersten und der zweiten Bestimmung berechnet. Diese Methode erwies sich als sehr genau, und der Unterschied zwischen der Haupt- und der parallelen Kontrollbestimmung wurde in unbedeutenden Größen ausgedrückt. Die Resultate der Analysen zeigten, daß die Menge der reduzierenden Zucker während der ganzen Reifezeit relativ fällt, und obgleich sie sich absolut auch verringert, so geht diese Verringerung nicht gleichmäßig vor sich und wird durch Momente eines erheblichen Ansteigens unterbrochen. Der Grund des letzteren liegt offenbar in dem verstärkten Zufluß der Glucose aus den Blättern. Was jedoch den Rohrzucker betrifft, so vergrößern sich, relativ fallend, seine Mengen absolut, von Zeit zu Zeit starke Abweichungen von dem regelmäßigen Laufe des Prozesses zeigend. Diese Abweichungen können nicht durch einen Bestimmungsfehler erklärt werden und stehen offenbar in Zusammenhang mit den Unregelmäßigkeiten im Speicherungsverlauf der stickstoffhaltigen Stoffe.

[1]) *O'Sullivan* and *Tompson*, Journ. Chem. Soc. Trans. 57, 834, 1890.

Ernte des Jahres 1913.

Reifestadien	Glucose		Saccharose	
	Proz.	g in 100 Samen	Proz.	g in 100 Samen
I	3,07	0,1030	2,23	0,0749
II	1,94	0,1460	2,69	0,2931
III	0,57	0,0858	2,21	0,3249
IV	0,21	0,0846	1,76	0,6890
V	0,23	0,1051	1,52	0,6986

In den Ernten des Jahres 1913 war folglich der absolute Glucosegehalt in 100 Samen am Ende der Reifezeit derselbe wie im Anfang, und mit voller Genauigkeit tritt das Fallen des Glucosegehalts im Verhältnis zu dem ersten Stadium nur in den Samenanalysen vom Jahre 1914 hervor. Leider gelang es nicht, das erste Stadium auf die Kohlehydrate zu analysieren, infolge von Mangel an Material.

Ernte des Jahres 1914.

Reifestadien	Glucose		Saccharose	
	Proz.	g in 100 Samen	Proz.	g in 100 Samen
II	5,80	0,2299	5,74	0,2276
III	2,55	0,1112	1,99	0,0868
IV	2,28	0,2150	2,78	0,2682
V	0,91	0,1108	3,10	0,3765
VI	0,96	0,1429	3,18	0,4705
VII	0,48	0,0872	2,62	0,4761
VIII	0,37	0,0872	2,01	0,4378
IX	0,39	0,1367	2,02	0,7081

Das lösliche Polysaccharid.

Ein Teil der Zuckerlösung wurde mit schwacher Salzsäure hydrolysiert und zeigte eine weitere, augenscheinlich durch die Spaltung irgend eines Polysaccharids, auf welches die Invertase nicht wirkt, hervorgerufene Vergrößerung der Reduktionsvermögen. Wahrscheinlich gehört dieses Polysaccharid zu den Galaktosederivaten, da sich bei Oxydation mit Salpetersäure des durch Kondensieren des Alkoholauszuges gewonnenen Sirups eine in Wasser unlösliche und bei 212 bis 214° schmelzende Schleimsäure gebildet hatte. Es gelang nicht, dieses Polysaccharid chemisch rein zu erhalten, da die in der Lösung enthaltenen Aminosäuren die Kristallisation verhinderten. Die Bestimmungen der Mengen dieses Polysaccharids wurden nur für die Ernte des Jahres 1914 getroffen. Den Resultaten der Analysen gemäß, vergrößerten sich die absoluten Mengen des löslichen Polysaccharids zum Ende des Reifens, die relativen blieben jedoch fast unverändert. Aber während der Reifezeit beobachtete man auch für dieses Kohlehydrat Perioden einer energischen Speicherung, die mit Perioden eines starken Verbrauchs abgelöst wurden.

Reifestadien	Lösliches Polysaccharid		Reifestadien	Lösliches Polysaccharid	
	Proz.	g in 100 Samen		Proz.	g in 100 Samen
II	2,68	0,1063	VI	2,19	0,3240
III	4,08	0,1779	VII	3,10	0,5633
IV	4,17	0,4023	VIII	1,34	0,3159
V	1,92	0,2337	IX	2,84	0,9956

Die Stärke.

Die Bestimmung der Stärke wurde mit *Mercks* Diastase ausgeführt. Die Resultate unterschieden sich von den Angaben anderer Autoren nur im Anfang und vor dem Ende des Reifens, als dieselben Erscheinungen beobachtet wurden, wie auch bei den übrigen untersuchten Kohlehydraten: eine energische Stärkespeicherung wurde von Momenten, wo ihr Verbrauch vorherrschte, unterbrochen.

Ernte des Jahres 1913.			Ernte des Jahres 1914.		
Reifestadien	Stärke		Reifestadien	Stärke	
	Proz.	g in 100 Samen		Proz.	g in 100 Samen
I	8,53	0,2864	II	19,41	0,7699
II	21,24	2,3146	III	11,92	0,5198
III	48,08	4,7532	IV	19,79	1,9090
IV	47,87	19,2875	V	30,62	3,6422
V	47,91	22,0195	VI	33,03	4,8871
			VII	33,62	6,1093
			VIII	29,96	7,0630
			IX	39,87	13,9765

Hemicellulosen.

Nach der Bestimmung der Stärke wurden die Zellenwände mit schwachem Alkali bearbeitet und mit verdünnter Schwefelsäure hydrolysiert. Nach Filtrieren und sorgfältigem Durchwaschen wurde das Filtrat mit den Waschwässern vereinigt, neutralisiert und bis zu einem bestimmten Volumen gebracht. Die Menge des reduzierenden, nach *Bertrand* bestimmten Zuckers wurde als der Menge der Hemicellulose entsprechend betrachtet. Die Natur der Monose, die zu ihrem Bestande gehörte, war nicht festgestellt worden. Die Bestimmungen wurden nur für die Samen der Ernten des Jahres 1914 gemacht. An den gewonnenen Resultaten lassen sich dieselben charakteristischen Züge wie auch bei den üblichen Kohlehydraten beobachten.

Reifestadien	Hemicellulose		Reifestadien	Hemicellulose	
	Proz.	g in 100 Samen		Proz.	g in 100 Samen
II	2,60	0,1008	VI	6,27	0,9277
III	2,05	0,0899	VII	7,53	1,3683
IV	4,23	0,4081	VIII	9,56	2,2538
V	7,48	0,8897	IX	4,47	1,5569

Zum Schluß des Reifens ließ sich folglich ein starkes relatives und absolutes Anwachsen der Hemicellulosen, das sich in dem ganz letzten Stadium durch einen jähen Fall ablöste, beobachten.

Wenn man als Multiplikator für den Übergang vom Stickstoff zu den Eiweißstoffen die Zahl 6 statt der gewöhnlichen 6,25 nimmt (nach *Osbornes*[1]) Angaben enthalten die Eiweiße von Vicia faba gegen 18 Proz. Stickstoff), wenn man weiter zuläßt, daß die nicht-eiweißähnlichen stickstoffhaltigen Verbindungen sich durch denselben Stickstoffgehalt auszeichnen, und wenn man die gewonnenen Resultate mit dem Kohlehydratgehalt und das Verhältnis des Eiweißstickstoffs zum gesamten Stickstoff während der verschiedenen Reifestadien vergleicht, so können die Resultate der angeführten quantitativen Untersuchung der reifenden Samen (Ernte des Jahres 1914) in folgende Tabelle zusammengefaßt werden:

Reifestadien	N-Verbindungen		Kohlehydrate		Eiweiß-N / Gesamt-N Proz.
	Proz.	g in 100 Samen	Proz.	g in 100 Samen	
I	38,76	0,9072	—	—	53,72
II	34,44	1,3608	36,23	1,4341	55,58
III	39,30	1,7136	22,59	0,9856	61,77
IV	36,24	3,4968	33,25	3,2026	67,47
V	30,12	3,6660	44,03	5,2529	74,83
VI	29,22	4,3236	45,63	6,7513	78,23
VII	30,24	5,5974	47,35	8,6042	79,79
VIII	31,08	6,3278	43,24	10,1577	81,28
IX	30,60	11,3370	49,59	17,3838	86,38

Die angeführten Angaben lassen den Schluß ziehen, daß im Moment des stärksten Fallens des Kohlehydratgehalts (drittes Stadium) auch die Speicherung der stickstoffhaltigen Stoffe überhaupt und der Übergang der nicht-proteinartigen Verbindungen im besonderen äußerst energisch stattfindet. Einstweilen kann man noch nicht entscheiden, ob es ein einfaches Zusammentreffen sei, oder ob zwischen den beiden Erscheinungen ein kausaler Zusammenhang bestehe. Das Vorhandensein des zweiten Fallens der Kohlehydratmenge, welches mit einiger Erhöhung des Gehalts der stickstoffhaltigen Stoffe zusammenfällt, spricht eher zugunsten der zweiten Vermutung. Es ist natürlich möglich, daß der Zufluß der Kohlehydrate und der stickstoffhaltigen Stoffe gleichsam als aufeinanderfolgende Wellen aus den Blättern kommt, wobei bald die eine, bald die andere Gruppe vorherrscht. Es ist sehr wahrscheinlich, daß die meteorologischen Faktoren (die Wirkung der atmosphärischen Niederschläge, die Dauer des Sonnenscheins, die kleineren oder größeren Feuchtigkeiten usw.) bei der Bildung dieser Wellen von Bedeutung sind, da das Reifen sehr langsam vor sich geht und das Wetter während seiner Dauer öfters wechselt. Außer dieser Erklärung ist aber auch ein anderer Fall möglich: Die verstärkte Eiweißsynthese erfordert für ihre Realisierung, wie jede endothermische Reaktion, einen Zufluß der freien Energie. Letztere jedoch wird aus den Atmungsprozessen, bei welchen der Kohlehydratverbrauch stattfindet, geschöpft. Diese Voraussetzung fordert natürlich eine experimentelle Prüfung, welche ich bis jetzt keine Möglichkeit hatte, zu machen.

---

[1]) *Th. Osborne*, The vegetable proteins 1909. S. 57.

Das Nachreifen der Samen.

Außer der Untersuchung der Samen, welche in natürlichen Bedingungen gereift sind, wurde von mir auch das Experiment mit dem Nachreifen der Bohnen, die, um die Samen von dem Einfluß der aus den Blättern zuströmenden Stoffe zu isolieren, von der Mutterpflanze gelöst waren, gemacht. Das Experiment hatte einen rein orientierenden Charakter und konnte leider bis jetzt nicht wiederholt werden. Inzwischen sieht man schon aus den erhaltenen Resultaten erstens die Wichtigkeit solcher Experimente[1]) für die Erkenntnis der synthetischen Prozesse bei dem Nachreifen, und zweitens die Unmöglichkeit, genaue Angaben zu erhalten, wenn man die Samen in den Hülsen aufbewahrt. Die aus den letzteren zuströmenden Stoffe beeinträchtigen stark die Klarheit des erhaltenen Bildes. Ebenso wurde die Notwendigkeit klar, die Samen in den Bedingungen vor minimaler Verdunstung zu bewahren und die bei der Atmung sich ausscheidende Kohlensäure zu messen.

Das Experiment wurde mit den am 12. August 1914 gesammelten Bohnen ausgeführt. Alle Früchte wurden in zwei Portionen geteilt, von denen die eine sofort von den Hülsen befreit wurde und die Samen bei 60 bis 70° getrocknet wurden, und die andere wurde für 10 Tage an einen kühlen dunklen Ort zwischen Blätter feuchten Filterpapieres gelegt. Das Trockengewicht einer Bohne war im Anfang des Versuchs 3,9313 g, am Ende 2,3350 g. Die Hülsenwände schrumpften ziemlich stark zusammen, hatten aber doch ein frisches Aussehen. Das Trockengewicht von 100 Samen war im Anfang 3,9644 g, am Ende 4,9950 g. Der Gehalt des Gesamtstickstoffs und des Eiweißstickstoffs hatte sich stark vergrößert, wobei der letzte auf 0,0083 g mehr als der erste zugenommen hatte; das entspricht 0,0498 g des Eiweißes, das sich unbedingt in den Samen auf Kosten der stickstoffhaltigen nicht proteinischen Stoffe der Samen gebildet hat und nicht aus den Hülsen im fertigen Zustande zugeführt worden ist. Mit voller Gewißheit kann man auch von einer Sythese beim Nachreifen der Hemicellulose, deren Gehalt sich fast verdoppelt hatte und die unbedingt, infolge ihrer Unlöslichkeit, nicht aus den Hülsen im fertigen Zustande herüberkommen konnte, sprechen. Recht stark hat sich auch die Menge des löslichen Polysaccharids vergrößert, aber welchem Umstande diese Vergrößerung zuzuschreiben ist, ist unmöglich, zu sagen: es hätte sowohl ein Zufluß aus den Hülsen als auch eine Synthese aus anderen Kohlehydraten sein können. Von den letzteren hat sich die Stärke nur wenig verändert, die Glucose jedoch und der Rohrzucker haben eine starke Verringerung erlitten, die offenbar einerseits durch den Verlust bei der Atmung, andererseits durch die Synthese der Hemicellulose und vielleicht des löslichen Polysaccharids bedingt ist.

---

[1]) Zum ersten Male wurden solche Experimente noch von *Lucanus* im Jahre 1860, und danach, für Stickstoffverbindungen, von *Wassilieff* und *Saliesskii* ausgeführt. Meine russische vorläufige Mitteilung war im „Bulletin de l'Academie Impériale des Sciences de St. Petersbourg" im Jahre 1916 veröffentlicht.

	Anfang		Ende	
	Proz.	g in 100 Samen	Proz.	g in 100 Samen
Gewicht von 100 Samen	—	3,9644	—	4,9950
Gesamt-N	5,74	0,2268	6,45	0,3189
Eiweiß-N	3,19	0,1265	4,59	0,2269
Eiweiß-N / Gesamt-N	55,58	—	71,15	—
Glucose	5,80	0,2299	3,78	0,1870
Saccharose	5,74	0,2268	3,42	0,1691
Lösliche Polysaccharide	2,68	0,1063	3,42	0,1691
Stärke	19,41	0,7695	16,07	0,7946
Hemicellulose	2,60	0,1008	4,74	0,2344

Die synthetischen Prozesse lassen sich folglich sowohl beim Reifen der Samen auf der Pflanze als auch bei ihrem Nachreifen unter künstlichen Bedingungen deutlich erkennen.

Basische stickstoffhaltige, nicht proteine Verbindungen in den reifenden Samen.

Der erste Hinweis auf das Vorhandensein der basischen, stickstoffhaltigen Körper in den reifenden Samen findet sich bei *N. J. Wassilieff*[1]), der im Jahre 1901 bei der Robinia pseudacacia und bei zwei Lupinusarten Arginin und Histidin gefunden hat. Darauf hat *N. Netokutschaieff*[2]) eine gewisse Menge näher nicht bestimmter Basen aus den unreifen Weizensamen ausgeschieden. Später haben *Pfenninger*[3]) bei der türkischen Bohne Alloxurbasen, Arginin, Cholin, Trigonellin, *Schulze* und *Winterstein*[4]) beim Weizen Alloxurbasen, Arginin und Histidin, bei den Erbsen Arginin, Histidin, Lysin, Alloxurbasen, Cholin und Trigonellin gefunden und endlich haben *Schulze*[5]) vom Vorfinden des Arginins und des Histidins bei der Wicke und *Kiesel*[6]) betreffs des Auffindens von Xanthin, Guanin, Adenin, Hypoxanthin, Histidin, Agmatin, Guanidin, Putrescin, Cholin und fünf unbestimmt gebliebenen Basen in Roggen mitgeteilt. Im Jahre 1917 habe ich eine russische Arbeit[7]) über das Vorhandensein einiger Basen veröffentlicht.

Der größte Teil meiner Untersuchung ist mit den am 14. September 1914 gesammelten Samen von Vicia faba minor gemacht, und nur zur nachträglichen Bestimmung einiger Stoffe waren Samen der Juli- und Augusternten verwandt. Das Trockengewicht von 100 Samen für Grundbestimmung betrug 32,6827 g, für die ergänzende Bestimmung jedoch wurde gemischtes Material, aber mit Vorherrschen der weniger - reifen

---

[1]) *N. J. Wassilieff*, Dniewnik XI. s'iesda russ. esstesstwoisp. 1901, S. 386.
[2]) *N. Nedokutschaieff*, Landw. Versuchsstat. 58, 279, 1903.
[3]) *H. Pfenninger*, Ber. d. Deutsch. bot. Ges. 27, 227, 1909.
[4]) *E. Schulze* und *E. Winterstein*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 65, 431—476, 1910.
[5]) *E. Schulze*, ebendaselbst 71, 31—48, 1911.
[6]) *A. Kiesel*, ebendaselbst 135, 61—83, 1924.
[7]) *A. Blagoveščenskij*, Journ. de la Soc. Botanique de Russie 2, 1—7, 1917 (russisch).

Stadien, genommen. Ein Kilogramm der ersten Samen wurde fein gemahlen, der Gehalt des Gesamt-N (5,11 Proz.) und des Eiweiß-N (4,39 Proz.) bestimmt und die übrigen wurden mit 5 Litern Wasser bei 50° ausgezogen. Sogleich nachdem ein regelmäßiges Anfeuchten erfolgt war (bei energischem Umrühren gelang es, es in ¼ Stunde zu erreichen), wurde der Auszug durch ein Koliertuch gegossen, der Rest mit der *Buchner*schen Presse abgedrückt und die Flüssigkeit bei schwachem Absaugen filtriert. Nach Entfernen der Eiweiße und der Peptone mit Bleiessig und des Bleiüberschusses mit schwacher Schwefelsäure, wurde die Flüssigkeit eingedampft und ihr Volumen bis zu 1 Liter gebracht. Die N-Bestimmung ergab 3,74 g desselben in 1 Liter. Die übriggebliebene Flüssigkeit wurde in eine große Porzellanschale gegossen, mit Baryt neutralisert und nach Hinzufügen des $BaCO_3$ und öfterem Wasserzugießen langsam bis zu einem kleinen Volumen verdampft. Nach Filtrieren und sorgfältigem Durchwaschen des Satzes mit kochendem Wasser wurde das Filtrat und die Waschwässer zusammengegossen und durch Abdampfen bis zu 1 Liter gebracht. Die Stickstoffbestimmung zeigte eine Verringerung seines Gehalts auf 4,25 Proz., was auf die Verflüchtigung des Ammoniaks zurückzuführen ist.

Nach Zerstörung der Amide durch Kochen mit 3proz. H_2SO_4 und nach Vakuumdestillation des Ammoniaks mit $BaCO_3$ (nach 1,49 Proz.) wurden die Flüssigkeit und die Waschwässer bis 500 ccm eingedampft, mit H_2SO_4 bis 5 Proz. angesäuert und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Der sorgfältig mit 1proz. Lösung der Phosphorwolframsäure in 5proz. Schwefelsäure durchgewaschene und in wässerigem Aceton gelöste Niederschlag wurde mit pulverartigem Ätzbaryt zersetzt, der Bariumüberschuß aus dem Filtrat mit H_2SO_4 entfernt, die Flüssigkeit bis 500 ccm eingedampft. Die Bestimmung ergab 1,09 g Stickstoff (= 31,35 Proz. des Gesamt-N des Auszuges). Die mit Schwefelsäure etwas angesäuerte Basenlösung wurde mit Ag_2SO_4 bearbeitet. Der Niederschlag wurde gesammelt und sorgfältig mit schwefelsaures Silber enthaltendem Wasser durchgewaschen, das Filtrat wurde jedoch mit den Waschwässern zusammengegossen, mit Barytwasser bis zu einer schwachsauren Reaktion neutralisiert, und dazu wurde ein Überschuß des $BaCO_3$ zugefügt. Zum Filtrat vom gewonnenen Niederschlage der Histidinfraktion wurde die gesättigte Ätzbarytfärbung bis zu einer stark alkalischen Reaktion hinzugefügt und Argininfraktion abfiltriert.

Für die ergänzende Analyse wurde 250 g fein gemahlener Samen verwandt. Der Auszug wurde nach Bleiessig mit salpetersaurem Quecksilber gefällt, der Niederschlag mit H_2S zersetzt und das Filtrat mit Ag_2SO_4 in Fraktionen geteilt.

Der in der sauren Mitte gewonnene Niederschlag der Silberverbindungen wurde im Wasser angerührt und bei der Temperatur eines Wasserbades mit HCl bearbeitet. Der heiß abfiltrierte Niederschlag des Chlorsilbers wurde mit stark verdünnter Salzsäure durchgewaschen. Das Filtrat wurde bei mäßigem Erhitzen und bei Aufschütteln zum Ende des Abdampfens wiederholt bis zur Trockne verdampft. Der Rest wurde mit kochendem Wasser ausgezogen, der Auszug kondensiert und bei Erhitzen mit Überschuß von 25proz. wässerigen Ammoniak bearbeitet. Nach 24 Stunden wurde der Niederschlag abfiltriert und mit 2proz. Ammoniak extrahiert. Nach weiteren 24 Stunden wurden alle Filtrate zusammengegossen und bis zur Trockne verdampft, der Niederschlag wurde in mit HCl angesäuertem Wasser gelöst, der ungelöste Teil abfiltriert und das Filtrat in der Kälte

mit gesättigter Natriumpikratlösung gefällt. Der gewonnene Niederschlag wurde sogleich abfiltriert, durch Auflösen in Ätzkalium und ein neues Niederschlagen mit Schwefelsäure gereinigt und gewogen. Im ganzen waren 0,3218 g Pikrat gewonnen. Die Bedingungen der Gewinnung, das Aussehen der Kristalle, Schmelzpunkt unter Zersetzung gegen 280 bis 281° sind denen des Adeninpikrats gleich. Der Gehalt des freien Adenins war als 0,1160 g berechnet.

Der im Ammoniak nicht aufgelöste Niederschlag wurde in schwacher Ätznatriumlösung gelöst und fiel beim Ansäuern mit Essigsäure wieder aus. Nachdem er getrocknet war, betrug er im ganzen 0,0044 g. Beim Abdampfen der Lösung dieses Niederschlages in Salpetersäure blieb auf dem Boden der Porzellanschale ein gelber Fleck, durch die Einwirkung des Ätznatriums in einen roten übergehend und beim Erhitzen eine blauviolette Färbung annehmend. Die angeführten Eigenschaften sind für Guanin charakteristisch. Die zu kleine Menge des ausgeschiedenen Stoffes erlaubte es nicht, es wieder zu identifizieren.

Der in mit Salzsäure angesäuertem Wasser ungelöste Teil der durch Ammoniak ausziehbaren Verbindungen wurde auf den Xanthingehalt mit Hilfe der charakteristischen farbigen Reaktionen untersucht. Beim Kochen mit Salzsäure und $KClO_3$, bei vorsichtigem Abdampfen der Lösung in einer Porzellanschale und bei Anfeuchten des trockenen Rückstandes mit Ammoniak erhielt man die für Xanthin charakteristische purpurviolette Färbung [*Weidels* Reaktion von *E. Fischer*[1]) verändert]. Ein positives Resultat ergab auch die Reaktion mit Salpetersäure und Ätzlauge. Diese Reaktionen erlauben es, mit einiger Wahrscheinlichkeit auf das Vorhandensein des Xanthins in der untersuchten Mischung zu schließen.

Das mit Ammoniak alkalisch gemachte Filtrat des Adeninpikrats wurde mit ammoniakalischer Silberlösung gefällt, der Niederschlag mit Salzsäure zersetzt, die freie Säure durch Abdampfen entfernt, der Rest mit Wasser bei 40° bearbeitet und zu der erhaltenen Lösung nach vorläufigem Kondensieren die gesättigte Natriumpikratlösung hinzugefügt. Nach 24 Stunden wurde der in Form von kleinen Täfelchen ausgefallene Niederschlag in kochendem Wasser aufgelöst und zu demselben die neutrale Lösung des salpetersauren Silbers zugefügt. Die nach einigem Stehen erhaltenen nadelförmigen Kristalle wogen 0,076 g, ihr Silbergehalt betrug 0,017 g, d. h. 22,37 Proz. Nach der Formel des Hypoxanthinsilberpikrats jedoch muß der Silbergehalt 22,91 Proz. sein.

Bei den ergänzenden Untersuchungen wurde der Niederschlag der Silberverbindungen der Purinbasen mit Schwefelwasserstoff zersetzt, und die Basen wurden in Carbonate übergeführt. Die Lösung der letzteren wurde bis zu einem kleinen Volumen eingedampft und für eine Nacht stehengelassen. Ein Niederschlag in Form von kugelförmigen Aggregaten feiner Kristalle fiel aus. Mit Wasser gewaschen und getrocknet, waren sie von einer blassen graugelben Farbe. Nach dem äußeren Aussehen des Niederschlages zu urteilen, konnte man auf das Vorhandensein des Tyrosins schließen, aber eine Probe mit dem *Millon*schen Reagenz ergab ein negatives Resultat. Dafür war die *Weidel-Fischer*sche Reaktion auf Xanthin äußerst scharf ausgeprägt. Allein der Niederschlag erwies sich nicht rein; bei der Murexidprobe erhielt man die rote Färbung schon unmittelbar nach dem Ab-

---

[1]) *E. Fischer*, Ber. d. Deutsch. chem. Ges. **31**, 2236.

dampfen mit Salpetersäure, was nur in Anwesenheit der Harnsäure der Fall ist. Außerdem erwies sich die bei weiterem Erhitzen mit Alkali gewonnene purpurrote Färbung als äußerst standhaft und hatte nach 24 Stunden ihre intensive Farbe fast gar nicht verändert (ein Kennzeichen von Guanin). Auf das Vorhandensein von Guanin wies auch die Unlöslichkeit im schwachen Ammoniak eines Teiles des Niederschlags hin. Da die Entdeckung der bis jetzt in den Pflanzen nicht aufgefundenen Harnsäure besonderes Interesse erweckt, wurden auf dieselbe folgende Reaktionen, die alle ein positives Resultat ergeben, gemacht: 1. Kleine Kristallmengen wurden auf einer Objektplatte mit Salzsäure bearbeitet. Der ungelöste Teil hatte bei der mikroskopischen Untersuchung das Aussehen von Harnsäurekristallen. 2. Nach vorsichtigem Erhitzen mit verdünnter Salpetersäure und nach Entfernen des Überschusses der letzteren wurden einige Tropfen Schwefelsäure und Benzol hinzugefügt. Es wurde eine blaue, beim Verdampfen des Benzols in eine dunkelorange übergehende Färbung erhalten (Denigésreaktion). 3. Mit Salzsäure und Phosphorwolframsäure gewann man einen hellbraunen Niederschlag. 4. Der in verdünnter Schwefelsäure gelöste Niederschlag entfärbte die Permanganatlösung. Alle diese Reaktionen weisen klar genug auf das Vorhandensein der Harnsäure in der untersuchten Mischung hin, man kann aber daraus nicht den Schluß von ihrem Vorhandensein als solche (obgleich man es auch nicht verneinen kann) in den reifenden Samen ziehen, da die Harnsäure sich sehr leicht durch Oxydation aus Purinen und Oxypurinen bildet und während der Analyse entstanden sein konnte[1]). Die Mutterlauge der gewonnenen Kristalle wurde in eine Salzsäurelösung übergeführt und auf schon beschriebene Weise bearbeitet. Es wurden von neuem das Adeninpikrat und das Hypoxanthinsilberpikrat abgeschieden.

Der Niederschlag von der Histidinfraktion wurde mit 350 ccm 5proz. Schwefelsäure zerrieben, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, das Filtrat vom Ag_2S bis 700 ccm gebracht und nach *Kossel* und *Patten*[2]) mit einem kleinen Überschuß von schwefelsaurem Quecksilber gefällt. Der Niederschlag wurde nach 24 Stunden abfiltriert und mit Schwefelwasserstoff zersetzt. Im Filtrat vom Schwefelquecksilber wurde der Stickstoff bestimmt. Es wurden 0,0375 g Stickstoff, die 0,204 g Histidin entsprechen, gefunden. Ein weiteres Identifizieren des letzteren konnte nicht ausgeführt werden, da die Lösung infolge eines unglücklichen Zufalls verloren ging. Das Filtrat und die Waschwässer vom Niederschlag mit Quecksilber wurden zusammengegossen, schwefelsaures Quecksilber wurde noch hinzugefügt, und nach einigen Tagen hatte sich ein Niederschlag gebildet. Nach seiner Zersetzung mit Schwefelwasserstoff und der nachfolgenden Behandlung erhielt man ein Pikrat, das in glänzenden Nadeln kristallisierte und bei 262 bis 264° schmolz. Sein Gewicht betrug 0,0163 g. Das Vorhandensein in der Histidinfraktion, die langsame Fällung mit schwefelsaurem Quecksilber, das Aussehen der Pikratkristalle und, teilweise, ihr Schmelzpunkt erinnert an Cytosin, dessen Pikrat bei 270° schmilzt. Die kleine Menge des erhaltenen Stoffes erlaubte sein weiteres Identifizieren nicht.

Nach Zersetzen des Niederschlags der Argininfraktion mit Schwefelwasserstoff wurde die Lösung von Schwefelsäure und Barium befreit und bis auf 280 ccm gebracht. Die Bestimmung ergab 0,4183 g Stickstoff. Danach wurde die Lösung kondensiert, erwärmt und Pikrinsäure hinzu-

---

[1]) *W. Jones*, Nucleic Acids 1914, S. 47—53. London.

[2]) *Kossel* und *Patten*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 38, 39, 1903.

gefügt. Beim Kristallisieren wurden zwei Fraktionen erhalten. Die Kristalle der ersten lösten sich im heißen Wasser leichter, sahen wie lange, zitronengelbe kleine Nadeln aus und schmolzen bei 207°, wie es für Arginin entspricht. Ihr Gewicht betrug 0,4835 g, was 0,1916 g reinen Arginins entspricht. Der andere Teil der Kristalle wog 0,025 g und löste sich bedeutend schwerer. Die Kristalle waren fein, orangefarbig. Beim Erhitzen begannen sie bei 280° schwarz zu werden, bei 300° sublimierten sie, bei 317° wurden sie mit reichlichem Ausscheiden gelbbrauner Dämpfe explosiv. Diese Eigenschaften ähneln denen, die von *Kutscher* und *Otori*[1]) für das Guanidinpikrat beschrieben worden sind.

Bei der ergänzenden Untersuchung wurde das Arginin als ein Kupferderivat seines Nitrats gewonnen. Es wurden 1,2970 g mit dem Schmelzpunkt 112° erhalten. Die Mutterlauge von dieser Verbindung wurde nach der Schwefelwasserstoffeinwirkung mit stickstoffsaurem Silber und Ammoniak bearbeitet und der Niederschlag in ein Pikrat übergeführt, das unter für Guanidin charakteristischen Bedingungen bei 314° zusammenschmolz.

Das Filtrat vom Fällen der Argininfraktion wurde von Silber und Salzsäure befreit und mit Phosphorwolframsäure gefällt. Die nach einer entsprechenden Behandlung erhaltene Carbonatlösung wurde mit Salzsäure übersättigt und abgedampft, bis ihr Überschuß entfernt war. Der Rest vom Abdampfen wurde im Vakuumexsikkator getrocknet und mit absolutem Alkohol ausgezogen. Der ungelöste Rest wurde weiter mit Methylalkohol beim Erhitzen bearbeitet. In dem gewonnenen, stark gefärbten Auszuge wurden vorwiegend anorganische (Kalium-) Salze gefunden, das Lysin abzuscheiden, gelang jedoch nicht.

Die Lösung der Basen in Alkohol wurde mit großem Überschuß der alkoholischen Sublimatlösung gefällt. Nach 2 Wochen wurde das Salz abfiltriert, mit Schwefelwasserstoff zersetzt, und die wässerige Chloridlösung wurde nach Hinzufügen von Na_2CO_3 bis 5 Proz. mit dem *Stanĕk*schen[2]) Reagenz gefällt. Sogleich fiel ein brauner pulverartiger Satz, der sich nach einiger Zeit in einen grünen kristallinischen verwandelte, aus. Auf ein stickstofffreies Filter gesammelt und durchgewaschen, wurde er nach *Kjeldahl* verbrannt. Es wurden 0,0534 g Stickstoff gefunden, was dem Cholingehalt in 0,4010 g entspricht.

Das Filtrat vom Cholinperjodid konnte Betain und ihm verwandte, nur in sauren Lösungen Perjodide gebende Verbindungen enthalten. Um diese Verbindungen abzuscheiden, wurde zur Lösung Schwefelsäure bis zum Gehalt von 10 Proz., Kochsalz bis zur Sättigung und das *Stanĕk*sche Reagenz hinzugefügt. Nach einigen Stunden wurde der grüne kristallinische Satz abfiltriert, mit gesättigter NaCl-Lösung durchgewaschen, mit Molekularkupfer bis zum Verschwinden des Jodgeruchs zersetzt und mit Kupferchlorid durchgekocht. Die gewonnene Chloridlösung wurde mit Goldchlorid bearbeitet. Beim Stehen über der Schwefelsäure schieden sich lange, nadelförmige, dunkelgelbe, ohne Zersetzung bei 123 bis 125° schmelzende Kristalle ab. Die zu kleine Stoffmenge erlaubte es nicht, die Natur des Stoffes festzustellen.

---

[1]) *Kutscher* und *Otori*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **43**, 101, 1904.

[2]) *Stanĕk*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **46**, 280 bis 285, 1905; **47**, 83 bis 87, 1906; **48**, 334 bis 346, 1906.

So muß man zu den in den reifenden Samen von früheren Forschern schon gefundenen Stoffen Guanidin, Cytosin und Harnsäure hinzufügen.

Die Peptase der reifenden Samen.

Das Vorhandensein der Proteasen in den reifenden Samen wurde in den Arbeiten *Deans*[1]), *Wassilieffs*[2]) und *Saliesskis*[3]) gezeigt. Folgende Versuche geben das Recht, den Schluß zu ziehen, daß man in die Zahl dieser proteoklastischen Fermente auch die Peptase mit einschließen muß.

Versuch 1. Die unreifen Samen von *Caragana arborescens* wurden von den Hülsen gereinigt, wobei aus jeder Bohne die eine Hälfte der Samen für die Analyse genommen und die andere getrocknet wurde. Das Gewicht der Portion von 512 Samen für das Trocknen betrug 8,10 g, für die Analyse (509 Samen) 8,17 g. Das Durchschnittsgewicht eines ungetrockneten Samens war 0,016 g. Die getrocknete Portion wog 1,6764 g. Die Samen der für das Experiment genommenen Portion wurden mit Toluol zerrieben und quantitativ in einen Kolben von 180 ccm übertragen. Für das Abwaschen des Mörsers und der Keule wurden genau 100 ccm Wasser verbraucht. Es wurden 5 ccm Toluol hinzugefügt.

	Zeitdauer	Amin-N [4]) mg	Gesamt-N mg	Gesamt-N / Amin-N
1. VII.	12h 35′	26,6	100,8	3,80
2. VII.	9 45	29,4	100,8	3,40
4. VII.	9 30	29,4	100,8	3,40

Versuch 2. Unreife Früchte von Trigonella foenum graecum (aus dem botanischen Garten des landwirtschaftlichen Instituts in Waronezsch) wurden von den Bohnenhülsen befreit und die Samen einer jeden Bohne in zwei Portionen geteilt. Die eine wurde sofort bei Zimmertemperatur getrocknet, die zweite in einen feuchten Raum untergebracht und nach 3 Tagen auch getrocknet. Das lufttrockene Gewicht der ersten Portion betrug 2,4080 g, das der zweiten 1,9600 g. Das Durchschnittsgewicht von 100 Samen der ersten Portion betrug 0,7432 g, das der zweiten 0,6282 g. Die getrockneten Samen wurden fein gepulvert, die Proben im 100-ccm-Kolben untergebracht und das Lösungsmittel (Wasser oder 4proz. Peptonlösung) und auch Toluol hingefügt. Je ein Kolben jeder Portion (wo das Wasser das Lösungsmittel war) wurde nach *Sörensen* sogleich abtitriert, die anderen blieben 48 Stunden bei 24 bis 26° stehen. Nach dem Titrieren nach *Sörensen* wurde der Inhalt aller Kolben nach *Kjeldahl* verbrannt.

[1]) *A. L. Dean*, Bot. Gazette 39, 521 bis 540, 1905.
[2]) *N. J. Wassilieff*, l. c.
[3]) *W. Saliesski*, Beih. z. bot. Centralbl. 27, 65 bis 82, 1911.
[4]) Nach *Sörensen* bestimmt.

Portionen	Probegewicht	Lösungsmittel	Amin-N mg	Gesamt-N mg	Gesamt-N / Amin-N
Ia	0,7850	25 ccm 4 proz. Pepton	44,8	210,4	4,70
Ib (Kontr.)	0,6560	25 ccm Wasser	9,5	31,9	3,35
Ic	0,9310	30 „ „	17,9	45,4	2,60
IIa	0,7365	25 ccm 4 proz. Pepton	46,5	209,5	4,50
IIb (Kontr.)	0,6245	20 ccm Wasser	8,7	31,9	3,70
IIc	0,5890	20 „ „	14,0	30,1	2,15

Anfänglicher Aminoindex $\left(= \frac{\text{Gesamt-N}}{\text{Amin-N}}\right)$ war für Ia = 9,07 und für IIa = 9,48.

Versuch 3. Die unreifen Früchte von Phaseolus vulgaris wurden am 24. August gesammelt. Die Samen wurden von den Hülsen befreit und getrocknet. Das Durchschnittsgewicht von 100 Samen betrug 2,91 g. (Das Durchschnittsgewicht von 100 reifen Samen von denselben Pflanzenindividuen betrug 51,19 g). Die Titration der Kontrollportionen wurde sofort nach dem Zugießen des Lösungsmittels (4 proz. Peptonlösung oder Wasser) in Versuchskolben gemacht. Die anderen Versuchslösungen blieben 48 Stunden bei 24 bis 26° stehen. Der anfängliche Aminoindex war für die Peptonlösung (der Berechnung nach) gleich 8,31.

Samenproben g	Lösungsmittel	Amin-N mg	Gesamt-N mg	Gesamt-N / Amin-N
1,7350	30 ccm 4 proz. Pepton	77,8	290,7	3,74
1,1070 (Kontr.)	20 ccm Wasser	11,2	51,8	4,68
1,0300	20 „ „	12,6	49,0	3,89

In allen angeführten Versuchen tritt die Wirkung der Peptase mit voller Klarheit hervor, und im Versuche mit Trigonella foenum graecum wurde sie auch für die bei künstlichen Bedingungen nachgereiften Samen gezeigt. Letztere vergrößerten außerdem während des Nachreifens etwas ihren Aminoindex, d. h., daß offenbar ein mit Verbindung der freien Aminogruppen vereinigter synthetischer Prozeß stattgefunden hatte. Es wäre interessant, den Zusammenhang zwischen dem Inhalt des pepto- und proteoklastischen Ferments und der Größe der Synthese der Proteine und Peptone in reifenden Samen zu verfolgen. Der Mangel an Material und die allgemeinen ungünstigen Verhältnisse erlaubten es nicht, diese Untersuchung zu machen; dieselbe wird aber von mir bei der ersten Möglichkeit ausgeführt werden. Für amylolytische Fermente, wie ich sogleich zeigen werde, ist solche Arbeit erfüllt.

Die Amylase in reifenden Samen.

Die von *A. C. Hill*[1]) im Jahre 1898 zum ersten Male festgestellte und durch zahlreiche Untersuchungen bestätigte Reversibilität der Fermentreaktionen kann den Schlüssel zum Verstehen der synthetischen Prozesse in den pflanzlichen und tierischen Organismen geben. Es ist jedoch bis jetzt

[1]) *A. C. Hill*, Journ. Chem. Soc. Trans. **73**, 634, 1898.

nicht gelungen, weder bei den Pflanzen, noch bei den Tieren direkte Beweise für solche synthetische Wirkung der Fermente zu finden, ausgenommen die Beobachtungen von *N. Iwanoff*[1]) über die synthetischen Prozesse bei der Hefenautolyse und von *S. Iwanoff*[2]) und *Dunlap* und *Gilbert*[3]) über die Ölbildung in den zerriebenen Samen der lipasehaltigen Pflanzen. Indirekte Beweise jedoch, die durch das Vorhandensein der Fermente an den Stellen der Neubildung von entsprechenden Stoffen begründet sind, wenn auch in einer kleinen Anzahl, sind schon längst bekannt. Äußerst wenig sind in dieser Hinsicht die reifenden Pflanzensamen, in welchen eine überaus energische Synthese verschiedener Reservenährstoffe stattfindet, erforscht. Die erwähnten Arbeiten von *S. Iwanoff* und *Dunlap* und *Gilbert* mit der Lipase, von *Fermi* und *Bascaglioni*[4]), *Saliesski*[5]), *Wassilieff*[6]), *Schulze* und *Winterstein*[7]) mit dem proteoklastischen und von *Johansen*[8]) mit dem invertierenden und zuckerbildenden Ferment beschränken sich nur auf das Konstatieren der in den reifenden Samen, klären ihre Fähigkeit aber nicht auf.

Die Aufgabe meiner Untersuchung war es, festzustellen, ob ein Parallelismus zwischen dem Stärke- und dem Amylasegehalt in den Samen verschiedener Reifestadien beobachtet werde. Zu diesem Zwecke wurden die Samen der Pferdebohnen (Vicia faba var. minor) genommen. Im Juli und im August wurden die reifenden Bohnen zu mehreren Zeitpunkten gesammelt, die Samen von den Hülsen befreit und bei gewöhnlicher Temperatur so rasch wie möglich getrocknet. Es wurden Samen von fünf Reifestadien mit folgendem Durchschnittsgewicht gewonnen. (Alle unten angeführten Daten sind auf absolutes Trockengewicht berechnet.)

Reifestadien:	I	II	III	IV	V
Gewicht v. 100 Samen, g	3,2280	10,4780	14,7010	36,9630	41,7820

Die Samen der letzten Stufe hatten ihre volle Reife noch lange nicht erreicht, aber weiteres Sammeln konnte infolge des von den Morgenfrösten hervorgerufenen Absterbens der Pflanzen nicht stattfinden.

Der Stärkegehalt erwies sich nach der Einwirkung der Diastase, der Hydrolyse der gewonnenen Maltose mit Salzsäure und der Bestimmung der Glucose nach *Bertrand* als folgender:

Reifestadien:	I	II	III	IV	V
Stärke . . . . . . Proz.	8,53	21,24	48,08	47,87	47,91
„ in 100 Samen, g	0,2864	2,3146	7,0682	19,2875	22,0195

---

[1]) *N. Iwanoff*, diese Zeitschr. **63**, 359 bis 368, 1914.

[2]) *S. Iwanoff*, Ber. d. bot. Ges. **29**, 595, 1911.

[3]) *F. L. Dunlap* and *Gilbert*, Journ. Amer. Chem. Soc. **33**, 1787, 1911.

[4]) *Fermi* et *Buscaglioni*, Centralbl. f. Bakteriol., II. Abt., **5**, 1899.

[5]) *W. Saliesski*, Ber. d. bot. Ges. **23**, 1905; Beitr. z. bot. Centralbl. **27**, 1911.

[6]) *N. Wassilieff*, l. c.

[7]) *E. Schulze* und *E. Winterstein*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **65**, 13, 1910.

[8]) *W. Johansen*, Justs bot. Jahresber. **1**, 143, 1897.

Die Intervalle zwischen den einzelnen Reifestadien als „Reifeperioden“ bezeichnend, erhalten wir folgende Größen für die Stärkezuwachse:

Periode:	I	II	III	IV
Zuwachs des Gewichts auf 100 Samen	7,2500	4,2230	22,2620	4,8220
Zuwachs der Stärke auf 100 Samen	2,0282	4,7532	12,2193	2,7320
Zuwachs der Stärke auf 1 g des gesamten Zuwachses	0,2798	1,1256	0,5493	0,5669

Die maximale Stärkespeicherung findet folglich während der zweiten Reifeperiode statt, wenn der Zuwachs der Stärke nicht nur die Vergrößerung des ganzen Trockengewichts deckt, sondern auch auf Kosten der anderen Kohlehydrate, die sich in den Samen befanden, nämlich zweifellos auf synthetischem Wege vor sich geht.

Um die Rolle der Amylase in dieser Synthese aufzuklären, wurde ihr Gehalt in den verschiedenen Reifestadien bestimmt. Zu diesem Zwecke wurde die 5proz. Lösung der löslichen Stärke zubereitet. Zu je 100 ccm dieser Lösungen wurden 0,25 g fein gepulverter Samen und 1 ccm Toluol hinzugefügt und sofort die Bestimmung der reduzierenden Fähigkeit gemacht. Nach 24 Stunden wurde die zweite Bestimmung gemacht. Die Kontrollportionen wurden, um das Ferment zu zerstören, vorläufig gekocht. Die Reaktion war bei allen unseren Versuchen neutral nach Rosolsäure. Nach 24 Stunden wurde bei den Kontrollösungen keine Veränderung der reduzierenden Fähigkeit merkbar. In den für das Experiment genommenen Lösungen waren jedoch folgende Mengen der Maltose vorhanden:

Reifestadien:	I	II	III	IV	V
Maltose . . . . g	0,3455	0,3060	0,3435	0,3575	0,1600

Zum Vergleich der Angaben in bezug auf den Stärkegehalt ist man gezwungen, eine Berechnung auf 100 Samen zu machen. Es erwies sich, daß 100 Samen aus der 5proz. Lösung der löslichen Stärke bei entsprechender Fermentkonzentration und während eines gleichen Zeitraums folgende Mengen der Maltose ausscheiden:

Reifestadien:	I	II	III	IV	V
Maltose . . . . g	4,7825	12,8250	20,3170	52,8600	26,7400

Die Quantitätsveränderung der auszuscheidenden Maltose auf 1 g des Gewichtszuwachses von 100 Samen beziehend und mit dem Stärkezuwachs vergleichend, erhalten wir:

Reifeperioden:	I	II	III	IV
Zuwachs von Stärke auf 1 g . .	+ 0,2798	+ 1,1256	+ 0,5493	+ 0,5669
Zuwachs d. ausscheidenden Maltose	+ 1,1135	+ 1,7740	+ 1,7313	— 5,4165

Da die Menge der ausscheidenden Maltose der Quantität (oder der Aktivität) der gegenwärtigen Amylase proportional ist, kann man aus den angeführten Angaben den Schluß ziehen, daß die Quantität der Amylase

nach dem Gang des Reifens sich ungefähr in einem Sinne mit der Veränderung der Intensität der Stärkespeicherung verändert. Das Maximum sowohl für den einen als auch für den anderen Prozeß fällt in die zweite Periode des Reifens. Die Abwesenheit eines vollen Parallelismus jedoch hängt offenbar davon ab, daß zugleich mit der Stärkesynthese aus der Maltose im Innern des Samens auch ein Zufluß verschiedener höherer Kohlehydrate aus den assimilierenden Organen stattfindet. Es ist möglich, daß es gelingen wird, wenn man diese maskierende Wirkung auf die eine oder die andere Weise eliminiert, einen vollen Parallelismus zwischen dem Fermentgehalt und der Intensität der Stärkespeicherung festzustellen und somit auch kategorisch den Schluß zu ziehen, daß im gegebenen Falle eine reversible fermentative Reaktion vorhanden ist.

Über die Änderung der Pufferung und die Aminostickstoffzunahme in einigen Nährsubstraten durch bakterielle Einwirkung.

Von

Leo Bleyer.

(Aus dem staatlichen Seruminstitut in Kopenhagen.)

(Eingegangen am 2. Februar 1925.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

Denkt man sich eine Polypeptidverbindung von der allgemeinen Formel $NH_2 . R_1 \ldots CO . NH . R_n . COOH$ hydrolytisch nach dem Schema $R{-}CO . NH{-}R = R . COOH + NH_2 . R$ in ihre Amino-
$+ OH \quad H$
endbausteine gespalten, so würde sich dieser Vorgang in einer Zunahme der Amino- und Carboxylgruppen verraten. Die Vermehrung dieser Gruppen könnte nun z. B. quantitativ erfaßt werden 1. durch Bestimmung des Amino-N und 2. durch Verfolgung der Änderung, welche das Pufferungsvermögen der Lösung dabei erfährt.

Ein einfaches Polypeptidmolekül, wie z. B. Glycylglycin ($NH_2 . CH_2 . CO{-}NH . CH_2 . COOH$), wird bei der hydrolytischen Spaltung in zwei Moleküle Glykokoll ($CH_2 . NH_2 . COOH$) zerlegt, wobei die Zahl der pufferungsfähigen Gruppen sich genau verdoppelt. Da hierbei aus der Säureamidbindung NH_2- und $COOH$-Radikale in demselben Verhältnis entstehen, in dem sie schon früher als endständige Gruppen vorhanden waren, müßte die Zunahme des Puffervermögens der Vermehrung des Amino-N ebenfalls genau parallel gehen, was auch tatsächlich zutrifft (unveröffentlichte Versuche von *O. M. Henriques*).

Das Glycylglycin stellt nur ein spezielles Beispiel für den allgemeinen Eventualfall dar, daß bei der Zerlegung von Polypeptidverbindungen die NH_2-Gruppen stets die Hälfte der puffernden Radikale

bilden. Eine derartige Spaltung ist jedoch an zwei Voraussetzungen geknüpft: 1. daß die Ausgangsverbindung eine Polypeptidkette ist, deren endständige Gruppen aus ebensoviel NH_2- als COOH-Radikalen bestehen, denn bei der Lösung der Säureamidbindung bilden sich natürlich immer NH_2 und COOH-Radikale in gleicher Zahl; 2. daß die Spaltung auf hydrolytischem Wege erfolgt. In allen Fällen, in welchen unter den endständigen Gruppen das Zahlenverhältnis der NH_2- zu den übrigen puffernd wirkenden Radikalen ein anderes ist oder der fermentative Abbau sich noch auf anderem als dem oben skizzierten hydrolytischen Wege vollzieht, wird man eine exakte Übereinstimmung zwischen Amino-N- und Pufferungszunahme theoretisch nicht erwarten können. Je höher strukturchemisch das zu zerlegende Molekül, mit desto komplizierteren Vorgängen und um so größerer Abweichung von obigem Schema wird man zu rechnen haben, zumal die Vorstellung, daß die Eiweißkörper lediglich eine sehr lange Polypeptidkette mit nur einer endständigen NH_2- und COOH-Gruppe bilden, keineswegs gestützt ist [s. *A. Fodor*[1])].

In dieser Studie wurde an der Zersetzung einiger Nährsubstrate unter bakterieller Einwirkung der Zusammenhang zwischen Amino-N und Pufferungszunahme verfolgt, und zwar durch lebende Kulturen (Züchtungsversuch) und durch deren Enzyme.

Methodisches.

Für die Amino-N-Bestimmung wurde im Prinzip die *Sörensen*sche Formolmethode angewendet. Auf den Barytzusatz wurde dabei verzichtet, da die Lösungen, praktisch genommen, fast frei von Carbonaten und Phosphaten waren und es nicht auf absolute Werte, sondern nur auf den Vergleich mit der in gleicher Weise behandelten Kontrolle ankam. Ausgeführt wurde die Bestimmung mit kleinen Mengen in Reagenzgläsern. (7,5 ccm der fünffach verdünnten Probelösung + 2,5 ccm etwa 10proz. Formalins.) Vor der Vermischung wurden Formalin- und Nährlösung mit n/10 NaOH auf $p_H = 9,0$ gebracht unter Anwendung von Thymolblau als Indikator und Vergleich mit einer Standardpufferlösung im *Walpole*schen Komparator. Nach eingetretener Reaktion wurde wieder durch Zutropfenlassen von n/10 NaOH aus einer Mikrobürette auf p_H 9 zurücktitriert und die hierbei verbrauchte Natronlaugenmenge als Maß für den vorhanden gewesenen Amino-N (Ammoniak-N) benutzt. Die in den Tabellen unter der Rubrik Formol-N stehenden Zahlen drücken aus, um wie viel sich der Amino-N in dem betreffenden Falle gegenüber der Kontrolle vermehrt hat (z. B. 1 = Kontrollwert, 2 = Zunahme auf das Doppelte).

Die Zunahme der Pufferung wurde untersucht durch Ermittlung der Titrationskurven auf kolorimetrischem Wege in der bei *O. M. Henriques*[2])

---

[1]) Die physikal.-chem. Grundlagen d. Biol. 1919, S. 270.

[2]) „Brintionmaalinger", Copenhagen, Levin & Munksgaards Forlag. 1924.

ausführlich beschriebenen Weise. Der an und für sich in Frage kommende Eiweißfehler der kolorimetrischen Methode konnte vernachlässigt werden, da, wie bei der Amino-N-Bestimmung, keine absoluten Werte, sondern nur der Vergleich mit der Kontrollkurve angestrebt wurde. In den weiter unten beigefügten Kurvenbildern finden sich auf der Abszisse die p_H-Werte eingetragen, während die Ordinaten die verbrauchten HCl- und NaOH-Mengen, umgerechnet auf 1 Liter Nährsubstrat und ausgedrückt in Normalitäten, darstellen. Die Titrationen selbst wurden nach Verdünnung der Nährsubstrate auf das Fünffache mit n/10 Lösungen unter Benutzung von Mikrobüretten innerhalb p_H 5 bis 9 (bei Casein infolge Ausfällung bei p_H 5 zwischen 6 bis 9) durchgeführt, also in jener Zone, in welcher das Pufferungsvermögen sogenannter „biologischer" Flüssigkeiten eine geradlinige Funktion zu sein pflegt. Mit Hilfe des Komparators war eine genaue Einstellung auf Farbengleichheit mit den Standardpufferlösungen immer leicht zu erzielen. Die benutzten Indikatoren waren Methylrot, Bromthymolblau, Phenolrot und Thymolblau.

Um der Zunahme des Puffervermögens einen zahlenmäßigen Ausdruck zu geben, wurden gerade Kurvenstücke der Kontroll- und der zu prüfenden Lösungen hinsichtlich der Winkel, mit denen sie die X-Achse schneiden, miteinander verglichen. Als bequemes Maß dieser Winkel dienten deren Tangenten, welche bei Zugrundelegung desselben Abszissenabschnittes als Basis 1 in der Zunahme der Ordinaten von einem Endpunkt des betreffenden Kurvenstückes zum anderen ihren direkten Ausdruck finden. Bei Zusammenfassung der Ergebnisse wird noch ausgeführt werden, daß es die Konfigurationsänderung der Titrationskurven bei den beimpften Substraten nötig machte, den Pufferindex für den sauren und alkalischen Kurvenanteil gesondert anzugeben. So wie beim Amino-N bedeuten die in den Rubriken Pufferindex (Px) stehenden Ziffern Verhältniszahlen, angebend, um wieviel die Pufferung im Einzelfall in bezug auf die Kontrolle zugenommen hat.

Die Auswahl der Bakterien, deren proteolytische Wirkung hinsichtlich obiger Fragestellung untersucht werden sollte, mußte sich auf solche richten, deren enzymatische Leistungen bereits als gute bekannt sind und bei denen stärkere Ausschläge erwartet werden konnten. Diese Forderung schien bei Pyoceaneus, Prodigiosus und Proteus zuzutreffen. Betreffs Orientierung über bakterielle Fermentleistungen sei auf *Baumgärtel*[1]) verwiesen. Die Beimpfung der Nährlösungen erfolgte mit jungen (24stündigen) Bouillonkulturen, die bei Proteus außerdem auf Indolbildung mit dem *Ehrlich-Böhm*schen Reagens geprüft wurden. Die Bebrütungsdauer erstreckte sich bei den mit Kurven versehenen Beispielen auf 5 bis 7 Tage. Der Ausgangs-p_H-Wert der Nährsubstrate ist aus den Schnittpunkten der Kontrollkurven mit der X-Achse ohne weiteres ersichtlich.

Vor Beginn der bakteriellen Versuche wurde die Verdauung von Casein durch Pankreatin Rhenania in oben beschriebener Weise geprüft, um an dem so gewonnenen Bild hydrolytischer Spaltung die weiteren Ergebnisse vergleichen zu können. Die gestrichelte Kurve ist die der verdauten und filtrierten Lösung. Das gerade Mittelstück von p_H 9 bis 6,5 kontrastiert in seiner Steilheit sehr zu dem adäquaten Kontrollabschnitt. Die Überein-

[1]) Theoretische Bakteriologie, Julius Springer, Berlin, 1924.

stimmung zwischen Formol-N und Pufferzunahme ist eine ungefähre ($Px = 90$ Proz. v. F), wie man sie bei der Unvollkommenheit der Methodik nicht genauer erwarten kann.

F = 4,0 (Formol-N-Zunahme).
Px_{7-8} 3,6 (Pufferungszunahme).

Im folgenden sind die Resultate der Bakterienexperimente wiedergegeben, wobei die Kurvenbeispiele nur eine Auswahl aus mehreren Versuchen darstellen. Die einzelnen Nährsubstrate waren nur in physiologischer NaCl-Lösung suspendiert und enthielten keinerlei sonstige Zusätze.

Abb. 1.

1. Versuche mit lebenden Kulturen.

a) 20 proz. Schafserum.

Nach drei- und siebentägigem Verweilen im Brutschrank bei allen drei Bakterientypen keine deutliche Veränderung von Formol-N und Pufferung.

b) Koaguliertes Schafserum.

	P_1	P_2
F	1,8	5,0
Px_{6-7}	2,5	4,0
Px_{8-9}	1,8	5,2

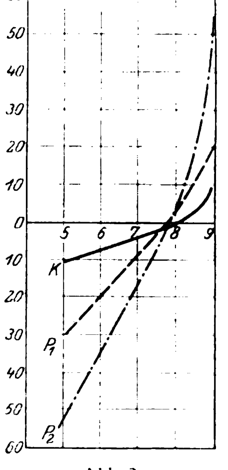


Abb. 2.

10 ccm Serum wurden in Kölbchen im Wasserbade bei 70 bis 80° koaguliert. Beimpfung auf doppelte Weise: einerseits Überschichtung mit 20 ccm Kochsalzlösung und Infektion mit Pyoc. (P_1), andererseits Beimpfung und Hinzufügung von Kochsalzlösung erst *nach* Beendigung der Bebrütung (P_2). In beiden Fällen wurde das Serum innerhalb 6 Tagen stark verflüssigt. Die Kurven illustrieren deutlich, daß der Abbau bei P_2 unter reichlichem Sauerstoffzutritt (Kulturrasen ohne Überschichtung) ein tiefgreifenderer war als bei P_1 unter schlechteren aeroben Bedingungen. Die Kontrollkurve ist die eines Serums ungefähr gleicher Konzentration. Übrigens zeigte sich, daß bei steriler Überschichtung des koagulierten Serums in entsprechendem Mengenverhältnis nach 6 Tagen die überstehende Flüssigkeit annähernd dieselbe Titrationskurve ergab, ein Zeichen, daß aus der Serumgallerte die puffernd wirkenden Substanzen hinausdiffundierten. Die Px-Werte stimmen im alkalischen Gebiet mit den F-Werten überein, in saurer Zone differieren sie.

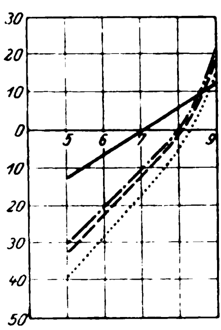


Abb. 3.
. — . . Prod.
— — — — Pyoc.
.... Prot. x19

c) 2proz. Wittepepton.

	Prot. x_{19}	Pyoc.	Prod.
F	2,3	1,8	3,6
Px_{6-7}	1,7	1,6	1,6
Px_{8-9}	2,2	3,5	3,5

Intensives Wachstum. Prot. x_{19} = ein gut Indol bildender Stamm. Pufferungszunahme hauptsächlich im alkalischen Gebiet.

d) Gelatine.

	Prot. x_{19}	Pyoc.	Prod.
F	2,2	6,3	4,4
Px_{6-7}	1,6	1,6	1,6
Px_{8-9}	6,5	12,5	9,2

Abb. 4.

In einer 1proz. Lösung kein Wachstum. 5proz. Glycerinzusatz führte bei Prot. x_{19} und Prod. zu einer Parallelverschiebung der Kontrollkurve (graphisch nicht wiedergegeben) in saures Gebiet bis etwa p_H 5,5 ohne Px- und F-Veränderung. Bei Pyoc. zeigten sich keinerlei Abweichungen.

Das Kurvenbild und die Tabelle zeigen die Wirkung auf 10proz. Gelatine. Nach beendeter Bebrütung (8 Tage bei 37°) erstarrte die Gelatine bei Zimmertemperatur nicht mehr. Auch hier ist wie bei Wittepepton die Puffererhöhung vorwiegend in der alkalischen Zone ausgeprägt. Prot. x_{19} = derselbe Stamm wie bei c).

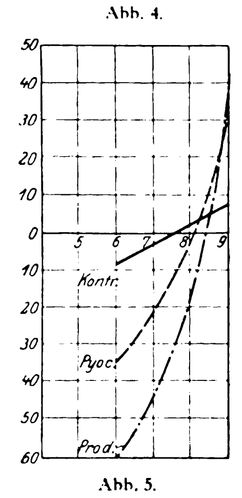


Abb. 5.

Abb. 6.

e) Casein.

Glycerinzusätze zu 2proz. Lösung führten wie früher bei Gelatine zu einer Verschiebung der Kontrolltitrationskurve in das saure Gebiet (nicht gezeichnet) ohne Pufferänderung. Die Formol-N-Werte waren gegenüber der Kontrolle etwas vermindert. (Verbrauch des vorhandenen Amino-N zum Aufbau von Leibessubstanz ohne Ergänzung desselben durch Bildung neuer Spaltprodukte aus dem Nährsubstrat ?)

10proz. Casein (s. Kurven und Tabelle): Von drei Pyoc. und drei Indol bildenden x_{19}-Stämmen

wirkte nur je einer deutlich proteolytisch, von drei Prod.-Stämmen zwei. Proteus vulg. bildete in der Vorkultur kein Indol.

	Prot. x_{19}	Prot. vulg.	Pyoc.	Prod.
F	1,8	2,1	1,7	3,1
Px_{6-7}	2,0	3,2	2,3	3,6
Px_{8-9}	2,0	3,4	3,1	4,3

f) Nährlösung nach Fermi.

5proz. Glycerin, 1prom. Ammoniumphosphat und 0,5prom. Dikaliumphosphat. Die von *Fermi* noch angegebenen Zusätze von Magnesiumphosphat und Tricalciumphosphat blieben hier weg. Das Wachstum in diesem primitiven Nährsubstrat, in welchem *Fermi* die Bildung proteolytischer Enzyme nachweisen konnte, war reichlich. Die Kurven zeigen Linksverschiebung in saurem Gebiet mit Pufferindexerhöhung, am deutlichsten bei Prodigiosus ausgeprägt. Bei der guten Vermehrung wäre an die Bildung von Glycerinsäure ($CH_2OH-CHOH-COOH$) bzw. Amidoglycerinsäure ($CH_2OH-CHNH_2-COOH$) als Grundbaustein für die neugebildete Leibessubstanz zu denken.

Abb. 7.

2. Versuche mit Bakterienenzymen.

Filtrate aus zweitägigen Bouillonkulturen zeigten keinerlei Effekt. Hingegen berichten *Parfitt* und *Spitzer*[1]), daß sie durch 24stündige Züchtung zuerst in Milch und dann 28 Stunden in Fleischbrühe gute Proteasen bei verschiedenen Bakterien (Prod., Aerogenes, Mesentericus usw.) gewinnen konnten, also innerhalb einer sehr kurzen Zeit. *Fermi*[2]) empfiehlt, die Kulturen etwa 1 Woche wachsen zu lassen. *Dernby*[3]) untersuchte die Abhängigkeit der Proteasenwirkung von der Wasserstoffionenkonzentration und fand für Gelatine und Wittepepton als äußerste Grenzwerte p_H 4 und 9, als Optimum eine Zone von etwa p_H 6 bis 7,5.

Die den Kurvenbeispielen zugrundeliegenden Enzymlösungen wurden aus acht- bis zehntägigen Bouillonkulturen durch Filtration durch Berkefeldkerzen und 0,5proz. Carbolzusatz hergestellt. Bei den x_{19}-Stämmen wurden nur gute Indolbildner verwendet. Auf 50 ccm Substrat kamen 5 ccm Filtrat. Für Wittepepton und Gelatine wurden dieselben Enzymlösungen angewendet mit gleichzeitiger makroskopischer Beobachtung ihrer Wirkung auf in Reagenzgläser abgefüllte Carbolgelatine. Nach 10 Tagen betrug die Verflüssigungstiefe bei Pyoc. = 18 mm, Prod. = 13 mm, x_{19} = 6 mm.

[1]) Journ. of Bact. **9**, Nr. 2. 1924.
[2]) Siehe die Übersicht über seine einschlägigen Arbeiten in Handb. d. Hyg. **3**, 1.
[3]) Diese Zeitschr. **126**, 105. 1921.

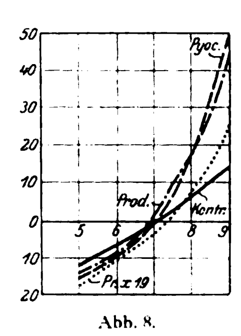


Abb. 8.

a) 2proz. Wittepepton.

	Prot. x_{19}	Pyoc.	Prod.
F	1,7	2,6	2,0
Px_{6-7}	1,1	1,2	1,7
Px_{8-9}	2,2	4,5	3,2

12 Tage Einwirkung. Pufferungszunahme zeigt sich fast ausschließlich im alkalischen Gebiet. Hinsichtlich der Wirkungsintensität gliedern sich die Enzyme in dieselbe Reihenfolge wie beim Gelatine-Reagenzglasversuch.

b) 10proz. Gelatine.

	Prot. x_{19}	Pyoc.	Prod.
F	2,1	4,5	4,4
Px_{6-7}	1,0	2,4	2,4
Px_{8-9}	2,0	9,0	6,6

10 Tage Einwirkung. Nach Unterbrechung desselben keine Wiedererstarrung der Gelatine bei Zimmertemperatur mehr. Qualitativ im wesentlichen dasselbe Bild wie bei Wittepepton.

Abb. 9.

c) 10proz. Casein.

	Prot. x_{19}	Pyoc.	Prod.
F	1,0	1,7	1,2
Px_{6-7}	2,0	2,6	1,0
Px_{8-9}	2,0	1,4	1,5

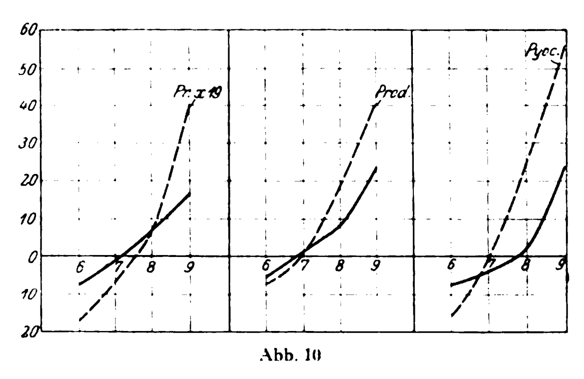


Abb. 10.

Die meisten Versuche, sowohl bei der Vorkultur in Fleischbouillon als auch pankreatinverdauter Caseinlösung, brachten negative Ergebnisse. Nur bei einigen zeigten sich wenigstens schwache proteolytische Wirkungen, die anbei wiedergegeben sind. x_{19}-Enzym erhöhte die Pufferung ohne Formol-N-Vermehrung.

8. Zusammenfassung der Ergebnisse.

Fast alle proteolytischen Kurven zeigen in ihrer Konfiguration die Eigentümlichkeit, daß sie in der p_H-Strecke 6 bis 9 mehr oder weniger keine Gerade mehr darstellen, sondern eine Linie, welche in flach geschwungenem Bogen gegen p_H 9 an Steilheit zunimmt, wobei ein Wendepunkt (-zone) zwischen p_H 7 bis 8 deutlich hervortritt. Diese Abweichung von der geradlinigen Funktion erschwert es natürlich, die Pufferungszunahme mit der Formol-N-Vermehrung in eine zahlenmäßige Beziehung zu bringen, da erstere in den einzelnen Kurvenabschnitten verschieden ausgeprägt ist und nur bei Berücksichtigung der Gesamtkonfiguration richtig eingeschätzt werden kann. Die unschwer zu erkennende, ziemlich scharfe Umbiegung gegen die alkalische Zone hin erlaubt es aber, mit Begehung eines kleinen Fehlers sich die Kurven im wesentlichen aus zwei Teilen zusammengesetzt zu denken, wobei man die Strecken jenseits der Wendezone als gerade betrachten und daraus leicht die Pufferindizes berechnen kann. Im Sinne dieser schematischen Korrektion sind die in den Tabellen enthaltenen P x-Werte zu verstehen. Der saure Kurvenschenkel ist durch die Strecke p_H 6 bis 7, der alkalische durch p_H 8 bis 9 charakterisiert.

Bei dieser Gegenüberstellung sieht man, daß *sich die Pufferungszunahme in den meisten Fällen vorwiegend in der alkalischen Strecke ausprägt* [ausgenommen 1 b) Pyoc.$_1$ und 2 c) Pyoc., in welchen Fällen das umgekehrte Verhältnis besteht]. Einen Rückschluß auf die Konstitution der hierfür maßgebenden Substanzen kann man daraus natürlich nicht ziehen, sondern es läßt sich eben nur allgemein die Abspaltung alkalibindender Gruppen vermuten.

Zieht man zum Vergleich mit der Amino-N-Zunahme die maximale Puffervermehrung heran, so ersieht man ohne weiteres, daß die *letztere die erstere in der überwiegenden Zahl der Fälle übertrifft und in einigen beide Prozesse ungefähr übereinstimmen*, so wie es sich bei der Pankreatinverdauung zeigte [1 c) Proteus x_{19} und Prod., 1 e) Pr. x_{19}, 1 b) Pyoc.$_2$, 2 b) Pr. x_{19} und 2 c) Prod.]. Sehr kraß sind die Unterschiede nur bei der Gelatineverflüssigung. Im Sinne des in der Einleitung Erörterten ließe sich daraus vermuten, daß die bakterielle Proteolyse noch andere Wege einschlägt als den der eingangs skizzierten hydrolytischen Lösung der Amidbindung.

Ein Vergleich der bakteriellen Kurven mit der Pankreatinkurve zeigt keine wesentliche Abweichungen. Der Grundtypus der biologischen Titrationskurve läßt sich auch an den bakteriellen Beispielen erkennen, wenn man bei ihnen die Wendezone als Übergang vom Mittelstück zum alkalischen Endstück auffaßt und sich letzteres gegen den Neutralpunkt zu verschoben denkt. Auch bei einem Vergleich zwischen den Wirkungen der Enzyme und denen der lebenden Kulturen

zeigen sich keine prinzipiellen Unterschiede, obwohl man ja bei letzteren nicht reine Abbauvorgänge vor sich hat, sondern mit einer Komplizierung durch Umsetzungsprozesse im Innern der Bakterienzelle und Abscheidung von Stoffwechselprodukten in die Kulturflüssigkeit rechnen muß.

In Kürze sind die Leistungen der verwendeten Bakterientypen noch in sonstiger Hinsicht zusammenzufassen: Proteolyse konnte nachgewiesen werden an denaturierten Eiweißkörpern und höheren Spaltprodukten (Pepton *Witte*) bei einem Ausgangs-p_H-Wert der Nährsubstrate von p_H 6,5 bis 8. Wittepepton, Gelatine und Casein wurden unter dem Einfluß der lebenden Kultur alkalisiert, während bei den Enzymversuchen teilweise eine leichte Säuerung hervortrat (Pyoc. und Prod.-Wirkung auf Gelatine, Pyoc.-Enz. und Casein). Aus glycerinhaltigen Nährmedien wurde Säure gebildet. Beim Abbau von koaguliertem Schafserum durch Pyoceaneus wirkte reichlicherer Sauerstoffzutritt begünstigend. Von den verwendeten Bakterien wiesen die Proteus x_{19}-Stämme die geringsten Leistungen auf; bei allen drei Bakterientypen war am inkonstantesten die Fähigkeit, Casein zu spalten, ohne daß damit bei den Proteusstämmen die Fähigkeit zur Indolbildung in der Vorkultur parallel gegangen wäre.

Über die Ausscheidung des Harnstoffs bei Pilzen.

Von

Nicolaus N. Iwanoff.

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institut der Universität zu Petersburg-Leningrad.)

(Eingegangen am 2. Februar 1925.)

Die Frage nach dem Gehalt und der Anhäufung von Harnstoff in Pilzen war bisher im wesentlichen noch ungeklärt. Einerseits war es unbegreiflich, warum nur einige Pilzarten den Harnstoff anhäufen, während bei anderen Vertretern nicht einmal Spuren desselben zu entdecken sind; andererseits beobachten wir große Schwankungen im Harnstoffgehalt bei Vertretern ein und derselben Gattung von Pilzen. In der letzten Untersuchung ist es sogar gelungen, festzustellen[1], daß der Fruchtkörper des gewöhnlichen Harnstoffanhäufers, Lycoperdon piriforme, gar keinen Harnstoff in irgend einer Stufe der Entwicklung enthielt; dieser Befund fand seine Erklärung in der sehr geringen Menge Gesamtstickstoff, die im Fruchtkörper des Pilzexemplars vorhanden war. Durch meine weiteren Versuche gelangte ich zu der Überzeugung, daß der Harnstoffgehalt in den Lycoperdons, Champignons usw. von einem Überschuß an Stickstoffnahrung des Pilzes und von einem Mangel an Kohlehydraten im Nährsubstrat abhängt. Die Feststellung dieser Tatsache führte auch zu den Kulturversuchen mit Champignons unter sterilen Bedingungen auf reichem stickstoffhaltigen Substrat — Gelatine mit Malzextrakt. Das Mycel des Champignons entwickelte sich in diesem Falle, und der Harnstoff ging in die Nährflüssigkeit über; als ich aber den Champignon in einem stickstoffärmeren Medium kultivierte, nämlich auf Agar mit Malzextrakt, gelang es mir nicht, Spuren von Harnstoff aufzufinden, obwohl sich das Mycel entwickelt hatte. Die Versuche mit reinen Kulturen haben somit ergeben, daß die Harnstoffanhäufung in Pilzen eine Nahrungsfunktion ist. Für einen endgültigen Beweis war es mir nötig festzustellen, daß auch andere Pilze Harnstoff bilden können, wenn

[1] N. N. *Iwanoff*, diese Zeitschr. **154**, 391, 1924.

dieselben unter den Bedingungen einer überschüssigen Stickstoffnahrung stehen. Die Lösung dieser Aufgabe würde einen großen Fortschritt in der Aufklärung der gesamten Frage über die Rolle des Harnstoffs in Pilzen bedeuten.

R. Fosse, der Schöpfer des sehr empfindlichen Xanthydrolverfahrens, hat gezeigt, daß man die Anwesenheit von Harnstoff bei höheren Pflanzen[1]) und bei zwei Schimmelpilzen[2]) feststellen kann; um aber die geringe Menge Dixanthylharnstoff, die zur Bestimmung des Schmelzpunkts ausreichen konnte, zu erhalten, war der Autor gezwungen, von Kilogrammen von Pflanzenmaterial auszugehen. Der Harnstoff konnte in diesen Versuchen durch Abspaltung aus irgend einer komplizierten Verbindung, wie Arginin, entstanden sein. Um die Behauptung zu erweisen, daß der Harnstoff eine wichtige Rolle in der Stickstoffnahrung der Pilze spielt, war es notwendig, genügende Mengen desselben in jedem einzelnen Falle zu erzielen und seine Bildung unter verschiedenen Versuchsbedingungen zu verfolgen. Zu diesem Zwecke erwiesen sich die Versuche mit höheren Hutpilzen als ungeeignet, da diese Pilze langsam wachsen — Monate sind erforderlich, bis in ihnen merkbare Mengen Harnstoff angehäuft werden. Daher verwendete ich die schnell wachsenden Schimmelpilze und versuchte durch Änderung der Nahrungsbedingungen in denselben eine Harnstoffanhäufung zu erzielen und dessen Umwandlung zu verfolgen.

Zur Bestimmung des Harnstoffs bediente ich mich, wie vordem, des empfindlichen Verfahrens von *Fosse*.

Die Nährlösung bestand aus Salzen: 0,1 g KH_2PO_4, 0,1 g $MgSO_4$, $FeSO_4$ (Spuren) und 1 mg $ZnSO_4$ auf 100 ccm Wasser. Zu dieser Lösung wurden noch 3 g Pepton oder 5 g Gelatine hinzugefügt.

Da es auf Grund meiner früheren Untersuchungen für die Harnstoffbildung von Wichtigkeit war, daß nicht nur große Mengen Stickstoff im Nährmedium zugegen waren, sondern daß gleichzeitig auch Mangel an Kohlehydraten herrschte, so führte ich meine ersten zwei Versuche mit der gewöhnlichen *Raulin*schen Flüssigkeit (100 ccm Wasser, 0,1 g KH_2PO_4, 0,1 g $MgSO_4$, 0,3 g NH_4NO_3 und 1 mg $ZnSO_4$) aus, der noch verschiedene Mengen Glucose hinzugefügt wurden.

Versuche mit Aspergillus niger.

Versuch 1.

Es wurde *Aspergillus niger* in vier Flaschen mit je 100 ccm *Raulin*scher Flüssigkeit ausgesät; als Kohlenstoffquelle diente Glucose, von der in die ersten drei Flaschen je 1 g, in die vierte 10 g hinzugefügt wurden. Die Kultur entwickelte sich im Verlauf von 4 Tagen bei 33°. Die Mycele

[1]) *R. Fosse*, C. r. **155**, 852, 1912.
[2]) *Derselbe*, C. r. **156**, 1913.

wurden leicht mit Wasser gewaschen. Die Kulturflüssigkeit mit den Waschwässern wurde auf den Gehalt an Restglucose und Harnstoff geprüft.

Portionen	Trockengewicht des Mycels g	Harnstoffmenge in der Kulturflüssigkeit mg	Harnstoff auf Trockengewicht des Mycels Proz.	Restglucose in der Flüssigkeit g	Ureasegehalt in Mycel
3 Portionen mit je 1 g zugefügter Glucose zusammen vereint .	0,99	3,64	0,367	0	abwesend
Portion mit 10 g zugefügter Glucose .	3,02	0	—	1,12	starke Urease

Die drei Kulturen der ersten Reihe mit 1 g Glucose hatten 3,64 mg Harnstoff in der Kulturflüssigkeit angehäuft, in den Mycelen war aber keine Urease vorhanden. In der Portion mit 10 g Glucose, in der diese nicht bis zu Ende ausgenutzt wurde, zeigte sich eine starke Ureasetätigkeit, dagegen war keine Spur Harnstoff zugegen.

Prüfung auf Urease. Es wurden je 0,4 g der gepulverten, bei 30° getrockneter Mycele entnommen und in Flaschen gebracht, welche je 5 ccm 0,5proz. Harnstofflösung und Toluol enthielten. Nach 24stündiger Aufbewahrung bei 16 bis 17° wurde die Menge des Harnstoffs bestimmt.

	Kontrolle	Mengen des zurückgebliebenen Harnstoffes in mg
1	Kein Mycel zugefügt	24,7
2	0,4 g Mycel von der 1. Kulturreihe zugefügt	24,3
3	0,4 g „ „ „ 2. „ „	0

Versuch 2.

100 ccm gewöhnlichen *Raulin*schen Gemisches + 1 g Saccharose; ausgesät *Aspergillus niger*; Entwicklung 4 Tage bei 33°, dann 10 Tage bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Zwei Kulturen wurden abfiltriert und das Mycel leicht mit Wasser gewaschen. Das Filtrat wurde zusammen mit dem Waschwasser, das keine Zuckerreaktion zeigte, auf dem Wasserbad eingedampft und mit Xanthydrol gefällt.

Aus dem Filtrate zweier Kulturen wurde erhalten:

Dixanthylharnstoff 44,8 mg, d. h. 6,4 mg Harnstoff. Das eine Mycel wurde getrocknet und in demselben der Gesamtstickstoff bestimmt.

Trockengewicht 0,2967 g, N 11,96 g, d. h. auf zwei Mycele 0,5934 g wurden 6,4 mg Harnstoff oder 1,08 Proz. erhalten.

Prüfung auf Urease. Das halbe Häutchen des zweiten Pilzexemplars wurde mit 30 ccm von etwa 0,5proz. Harnstoff zerrieben.

Eine Probe von 5 ccm wurde gleich nach dem Zerreiben entnommen, es waren darin 24,7 mg Harnstoff enthalten.

Eine gleiche Probe von 5 ccm wurde nach dreitägigem Stehen mit Toluol entnommen. 24,7 mg Harnstoff waren vorhanden, d. h. die Urease fehlte vollständig und in der Kulturflüssigkeit hatten sich 6,4 mg Harnstoff gebildet.

Hieraus geht hervor, daß sich bei überschüssiger Stickstoffnahrung (in diesem Falle waren 0,3 g NH_4NO_3 zu 100 ccm Flüssigkeit hinzugefügt

worden) und bei Mangel an Saccharose merkbare Mengen Harnstoff gebildet hatten, dagegen war keine Spur von Urease festzustellen. Diese Beobachtung erklärt viele Tatsachen, die über die Urease der Pilze bekannt sind.

Die Urease ist in *Aspergillus niger* von *Shibata*[1]) (1904) aufgefunden worden. Später konnte *Kiesel*[2]) in genaueren, an demselben Objekt angestellten Untersuchungen zeigen, daß in Pilzen, die eine starke Urease aufweisen, kein Harnstoff zu finden ist. Der Harnstoff kommt bei einigen höheren Pilzen vor, die eine nur ziemlich schwach wirkende Urease enthalten. Öfters wurde ich[3]) zur Annahme eines vollständigen Fehlens der Urease bei Champignons und Lycoperdons gezwungen, welche große Mengen Harnstoff enthielten. *A. Goris* und *P. Costy*[4]) sowie *P. Costy*[5]) haben gezeigt, daß die Urease bei vielen Pilzen bald in größeren, bald in kleineren Mengen vorhanden ist, je nach der Art und Gattung des betreffenden Pilzes. Die oben angeführten Versuche, wie auch die folgenden, beweisen, daß in ein und derselben Art von Pilzen je nach deren Nahrung die Urease entsteht, so z. B. bei Stickstoff- und Kohlehydratüberschuß; fehlt die Kohlehydratquelle, so wird keine Urease gebildet, dagegen wird Harnstoff bei überschüssiger Stickstoffnahrung als Abfallsprodukt angehäuft. *R. Fosse*[6]), der die Bildung von Urease und Harnstoff in vielen Pflanzen festgestellt hat, hebt besonders hervor, daß die gleichzeitige Gegenwart dieser beiden Substanzen notwendig sei: fehlte das Ferment, so würde der Harnstoff nicht verbraucht werden. Nach meinen Angaben kann die Urease im Pilze je nach den physiologischen Bedingungen entstehen und verschwinden; häuft sich der Harnstoff an, so weist die Urease keine Wirksamkeit auf, indem sie wahrscheinlich in den zymogenen Zustand übergeht. Ferner wurden Kulturen von *Aspergillus niger* auf stickstoffreichem Substrat erhalten: es wurden 500 ccm Wasser + 100 ccm Malzextraktlösung + 60 g Gelatine genommen; die Kulturen wurden mit und ohne Saccharose aufgestellt. Die Mycele entwickelten sich besonders in den Saccharosekulturen.

Versuch 3.

Es wurden in Petrischalen gebracht: 1. 10 ccm Gelatine mit Malzextrakt, 2. dasselbe + 0,4 g Saccharose, mit Sporen von *Aspergillus niger* besät. Die Temperatur des Thermostaten betrug 33°. Nach 6 Tagen wurden die Mycelhäutchen leicht mit Wasser gewaschen; in den Mycelen wurde das Trockengewicht und die Menge des Gesamtstickstoffs bestimmt, in der Kulturflüssigkeit der Harnstoffgehalt.

		Trockengewicht des Mycels g	Harnstoffmenge in der Kulturflüssigkeit mg	Harnstoff auf Trockengewicht des Mycels Proz.
1	Ohne Zucker	0,0628	7,07	11,25
2	Mit 0,4 g Saccharose	0,1790	0	—

1) *K. Shibata*, Beitr. z. chem. Physiol. u. Pathol. **5**, 321, 1904.
2) *Al. Kiesel*, Zeitschr. f. phys. Chem. **75**, 169, 1911; **118**, 247, 1922.
3) *N. N. Iwanoff*, diese Zeitschr. **150**, 115, 1924.
4) *A. Goris* et *P. Costy*, C. r. 1922.
5) *P. Costy*, Uréase et urée chez les champignons supérieurs. Paris 1923.
6) *R. Fosse*, Ann. de l'Institut Pasteur **34**, 1, 1920.

In der Kulturflüssigkeit der zweiten Portion war der Zucker im Verlauf von 6 Tagen völlig verbraucht worden. Folglich hat sich der Harnstoff in merkbarer Menge nur in der Kultur ohne Zucker gebildet. Charakteristisch ist, daß sich der Harnstoff nur in der Kulturflüssigkeit angehäuft hat.

Im folgenden Versuch wurde dasselbe Nährsubstrat gewählt, nur mit der Zugabe von Nährsalzen von gewöhnlichem Prozentgehalt: KH_2PO_4, $MgSO_4$, $FeSO_4$ (Spuren) und 1 mg $ZnSO_4$ auf 100 ccm Lösung.

Versuch 4.

In Petrischalen wurden gebracht: 1. 10 ccm Gelatine mit Malzextrakt, 2. dasselbe + 0,4 g Saccharose; mit Sporen von *Aspergillus niger* besät. Temperatur 33°. Nach Beendigung des Versuchs wurde die verdünnte Gelatine filtriert und das Mycel leicht mit Wasser gewaschen.

Entwicklungszeit	Ohne Zucker			Mit Zucker		
	Trockengewicht des Mycels g	Harnstoffmenge in der Kulturflüssigkeit mg	Harnstoff auf Trockengewicht Proz.	Trockengewicht des Mycels g	Harnstoffmenge in der Kulturflüssigkeit mg	Harnstoff auf Trockengewicht des Mycels Proz.
3 Tage . . .	0,112	3,65	3,25	0,721	0	—
11 „ . . .	0,143	6,25	4,38	0,980	0	—

Aus den Versuchen ist zu ersehen, daß die Harnstoffmenge ohne Zusatz von Saccharose steigt und der erstere gar nicht gebildet wird in der Portion, der Saccharose zugefügt worden war. Alle diese Versuche erklären uns, warum keine Harnstoffanhäufung in auf Zucker wachsenden Pilzen zu erzielen ist.

Unter den Bedingungen einer stickstoffreichen Nahrung (auf Gelatine) zersetzt der sich entwickelnde Pilz den Harnstoff in Aminosäuren und aus den letzteren baut er seinen Körper auf. Aber zum Aufbau des Körpers wie auch zum Atmungsprozeß sind Kohlehydrate erforderlich, die der Pilz ebenso aus den Aminosäuren aufbaut; das bei der Desaminierung derselben entstehende Ammoniak wird in Harnstoff[1]) übergeführt. Letzterer geht als Abfallsprodukt in die Kulturflüssigkeit über; der Pilzkörper häuft in allen Fällen keinen Harnstoff an. Dies ist das Schema der Stickstoffumwandlung in meinen Versuchen.

Längst ist bekannt, daß Schimmelpilze fähig sind, Stickstoff und Kohlenstoff aus Eiweißstoffen und Peptonen zu schöpfen; im weiteren habe ich Versuche mit gewöhnlicher *Raulin*scher Salzflüssigkeit unter Zugabe von je 3 g Pepton *Witte* auf 100 ccm angestellt.

Versuch 5.

In 100 ccm Kulturflüssigkeit (auf 100 ccm Wasser 0,1 g KH_2PO_4, 0,1 g $MgSO_4$, 3 g Pepton *Witte*, 1 mg $ZnSO_4$) wurde *Aspergillus niger* ausgesät; Entwicklung bei 33°. Nach Verlauf einer bestimmten Zeit wurde das Mycelhäutchen entnommen, leicht mit Wasser gewaschen, zuerst bei

[1]) Nach meinen vorläufigen Versuchen ist zu schließen, daß nicht das gesamte Ammoniak in Harnstoff übergeht, da in der Flüssigkeit bedeutende Mengen von Ammoniumsalzen zurückbleiben.

33° getrocknet und aus demselben eine Probe für die Urease gewählt; dann bei 110° getrocknet und für die Stickstoffbestimmung verwendet. In der Kulturflüssigkeit und in dem Waschwasser wurde der Harnstoff bestimmt.

Alter des Pilzes	Trockengewicht des Mycels g	Harnstoffmenge in der Kulturflüssigkeit mg	Harnstoff auf Trockengewicht des Pilzes Proz.	Gesamt-N im Mycel mg	Harnstoff-N in der Flüssigkeit mg	Harnstoff-N zum Gesamt-N des Mycels Proz.
5 Tage . . .	0,30	9,95	3,31	23,85	4,6	19,3
8 „ . . .	0,56	33,65	6,0	42,55	15,71	37,9
12 „ . . .	0,63	48,6	7,5	46,78	22,69	48,5

Das Mycel wurde auf Urease geprüft: In 5 ccm 5 proz. Harnstoff wurde je 0,1 g Mycel, bei 33° getrocknet, hinzugefügt, dann Toluol zugesetzt und auf 24 Stunden stehengelassen; nach Verlauf dieses Zeitraums war kein Harnstoffzerfall zu konstatieren.

Es wurde noch ein Versuch angestellt, Harnstoff im Mycel selbst aufzufinden; zu diesem Zwecke wurden 0,3476 g eines achttägigen Mycels mit Wasser auf siedendem Wasserbad extrahiert und im Filtrat der Harnstoff bestimmt; nach der Fällung mit Xanthydrol konnten nur Spuren von Harnstoff wahrgenommen werden.

Die Harnstoffmenge steigt in diesen Versuchen je nach der Entwicklung des Pilzes, der, wie bekannt, auf Pepton viel langsamer wächst als auf Zucker und NH_4NO_3. Die Menge des entstandenen Harnstoffs kann man auf das Trockengewicht des Mycels beziehen, dann erhalten wir 7,5 Proz. gebildeten Harnstoff; oder wir können das Verhältnis des Harnstoffstickstoffs zum Gesamtstickstoff des Mycels berechnen; in diesem Falle sehen wir, daß auf Harnstoffstickstoff 48,5 Proz. Gesamtstickstoff des Mycels kommen — genügend beweisende Zahlen.

Eine besonders wichtige Tatsache ist in diesen und in anderen Versuchen das fast völlige Fehlen des Harnstoffs im Mycel selbst; der Pilz wirft denselben in das umgebende Medium aus. Besonders sorgfältig beugte ich der Entgegnung vor, daß der Harnstoff aus dem Pilz mit dem Waschwasser entfernt werden könne, daher wurde das Mycel stets nur leicht im Wasser ausgespült. Außerdem wurde noch ein Versuch angestellt, bei dem das Mycel gar nicht ausgewaschen wurde.

Versuch 6.

Ebenso wie im vorigen (Salze + 3 g Pepton). Kultur *Aspergillus niger*, während 10 Tage bei 28 bis 30°. *Das Mycel auf dem Filter wurde nicht mit Wasser gewaschen*, sondern nach dem Ablaufen der Kulturflüssigkeit wurde das feuchte, 6,5 g wiegende Mycel bei 33° getrocknet; es ergab 0,53 g Trockengewicht. Der Harnstoff wurde im Mycel und in der Kulturflüssigkeit bestimmt; es waren vorhanden: in der Kulturflüssigkeit 22,3 mg, im Mycel 0,8 mg. Die Probe auf Urease im Mycel ergab negative Resultate.

Ferner wurde noch ein *Versuch auf festem Medium*, Gelatine und Agar, angestellt.

Versuch 7.

In ein Kulturmedium aus 100 ccm wässeriger Lösung von Nährsalzen, 5 g Gelatine und 2 g Agar wurde *Aspergillus niger* ausgesät; nach 11 Tagen bei 33° wurde der Versuch beendet. Von dem festen Nahrungsmedium

wurde das Mycel vorsichtig entfernt und, ohne Auswaschen mit Wasser, in demselben der Harnstoff bestimmt; das Nährmedium wurde zweimal mit Alkohol extrahiert und im Extrakt der Harnstoff bestimmt.

Es waren vorhanden Harnstoff im Mycel 3,27 mg, im Kulturmedium 18,92 mg. Zweifellos war im Mycel selbst bedeutend weniger Harnstoff enthalten, weil es sehr schwierig war, das Mycel von dem anhaftenden festen Kulturmedium ganz rein zu trennen, aber selbst dieser Versuch zeigt deutlich, daß die *Hauptmenge des Harnstoffs aus dem Pilze in die äußere Umgebung ausgeschieden wird.*

Die Versuche führen zu der Überzeugung, daß die Pilze auf stickstoffreichem Substrat nicht nur Harnstoff bilden können, sondern auch, ähnlich den höheren Tieren, befähigt sind, denselben aus dem Organismus als Stickstoffabfallsprodukt zu entfernen.

Die von mir erzielte Harnstoffanhäufung bei *Aspergillus niger* wird zurzeit an vielen anderen Pilzen untersucht.

Bezüglich der Hefe war in der Literatur schon längst die Frage nach den Stickstoffexkrementen aufgestellt worden. *Pasteur*[1]) hatte festgestellt, daß ein Extrakt gegorener Hefe, von Kohlensäure und Alkohol befreit, viel weniger zu einer neuen Gärung verwendbar sei, als ein wässeriger Auszug aus ungegorener Hefe, obgleich in demselben weniger Stickstoff enthalten war. *Ad. Mayer*[2]) untersuchte diese Erscheinung und schuf eine Theorie der Hefeexkremente; dasselbe berührte auch *H. Pringsheim*[3]), wie auch *Rubner*[4]), welcher von einer Bildung von für die Ausnutzung der Hefe wertlosen Stickstoffverbindungen, welche nach außen ausgeschieden werden können, spricht. In meiner Arbeit über diesen Gegenstand kam ich[5]) zur Erklärung der Stickstoffexkremente von einer ganz anderen Seite – es war mir gelungen zu zeigen, daß die Stickstoffverbindungen, welche während der Gärung auftreten, nicht mit derselben verbunden sind, sondern das Resultat einer freien Synthese von Glucose mit Ammoniak oder Aminosäuren darstellen. Somit ist die frühere Annahme hinfällig, daß die Hefe irgendwelche Stickstoffexkremente ausscheiden könne, die sich (nach *A. Mayer*) in Wasser lösen und durch Alkohol gefällt werden könnten. Meine gegenwärtigen Versuche zeigen die Möglichkeit der Bildung von Stickstoffabfallsprodukten bei Pilzen in Form von Harnstoff.

Um die Bedeutung der Kohlehydrate bei der Bildung von Harnstoff darzutun, wurden vergleichende Versuche angestellt in betreff der Pilzentwicklung auf Pepton in Gegenwart und Abwesenheit von Saccharose.

Versuch 8.

In 100 ccm Kulturflüssigkeit: 1. 100 ccm Wasser, 0,1 g KH_2PO_4, 0,1 g $MgSO_4$, 3 g Pepton, 1 mg $ZnSO_4$; 2. desgleichen + 2 g Saccharose wurde *Aspergillus niger* gesät. Temperatur 33°.

---

[1]) *L. Pasteur*, Ann. d. Chim. 58, 407, 1860.

[2]) *Ad. Mayer*, Untersuchungen über die alkoholische Gärung, den Stoffbedarf und Stoffwechsel der Hefepflanze. Heidelberg 1869.

[3]) *H. Pringsheim*, diese Zeitschr. 8, 121, 1907.

[4]) *M. Rubner*, Die Ernährungsphysiologie der Hefezellen bei alkoholischer Gärung. Leipzig 1913.

[5]) *N. N. Iwanoff*, diese Zeitschr. 120, 25, 1921.

Alter des Pilzes	Pepton ohne Saccharose			Pepton mit 2 g Saccharose		
	Trockengewicht des Mycels g	Harnstoff in der Kulturflüssigkeit mg	Harnstoff auf Trockengewicht Proz.	Trockengewicht des Mycels g	Harnstoff in der Kulturflüssigkeit mg	Harnstoff auf Trockengewicht des Mycels Proz.
5 Tage	0,30	9,95	3,31	1,69	0	—
8 „	0,62	33,1	5,3	1,75	0	—

In Gegenwart selbst unbedeutender Mengen Zucker entsteht kein Harnstoff.

Versuch 9.

Dasselbe Kulturmedium (Salze + 3 g Pepton) mit Zugabe von 10 g Saccharose. *Aspergillus niger bei 33°.*

Alter des Pilzes	Trockengewicht des Mycels g	Harnstoffmenge in der Flüssigkeit	Rest von Saccharose g	Urease im Mycel
4 Tage	5,40	0	1,23	stark wirkende Urease
9 „	5,80	0	0	fehlt

Bei der Entwicklung des Pilzes auf Pepton in Gegenwart von Saccharoseüberschuß bemerken wir eine starke Ureasewirksamkeit; im alten Pilze (9 Tage), als der Kohlehydratvorrat erschöpft war, ist auch die Urease verschwunden.

Weiter habe ich mir die Aufgabe gestellt, zu ermitteln, ob der entstandene Harnstoff von neuem vom Pilz verbraucht wird, wenn man demselben unter sterilen Bedingungen Kohlehydrat verabreicht. Zugleich hoffte ich in diesem Falle eine Ureasetätigkeit zu erzielen, da diese, wie aus den vorherigen Versuchen zu ersehen ist, bei der Pilzkultur auf Pepton ohne Saccharose sich nicht gebildet hat.

Versuch 10.

In 100 ccm Kulturflüssigkeit (Salze + 3 g Pepton) wurde *Aspergillus niger* ausgesät; Temperatur 33°. Von drei gleichen Kulturen war die eine nach 12 Tagen beendet, die zweite wurde noch 2 Tage stehengelassen, ohne Zugabe von Saccharose, die dritte ebenfalls noch 2 Tage, mit Zugabe von 10 g Saccharose unter sterilen Bedingungen.

Nr.	Alter des Pilzes	Trockengewicht des Mycels g	Harnstoffmenge in der Kulturflüssigkeit mg	Harnstoff auf Trockengewicht Proz.	Gesamt-N im Mycel mg	Harnstoff-N in der Kulturflüssigkeit mg	**Harnstoff-N zum Gesamt-N des Mycels Proz.**
1	12 Tage . .	0,63	48,6	7,5	46,78	**22,69**	**48,5**
2	14 „ . .	0,616	47,9	7,77	43,6	**22,36**	**51,3**
3	12 „ dann Zugabe von 10 g Saccharose unt. sterilen Bedingungen u. noch 2 Tage bei 33°	3,61	7,55	0,21	195,6	**3,52**	**1,8**

Vergleicht man die Kulturen 2 und 3 mit der 12tägigen, so ergibt sich folgendes: In der Kultur ohne Zugabe von Saccharose war die Harnstoff-

menge nach 2 Tagen, in Prozenten ausgedrückt, von 7,5 bis auf 7,77 gestiegen; in der Portion, die sich während der letzten 2 Tage mit 10 g Saccharose entwickelte, war der Harnstoff fast verschwunden, und das Trockengewicht des Mycels war um das Sechsfache gestiegen[1]). Prüfung auf Urease: Zu 5 ccm 0,5proz. (annähernd) Harnstoffs wurde je 0,1 g lufttrockenen Mycels der zweiten und dritten Portion hinzugefügt und auf 24 Stunden mit Toluol stehengelassen; dann wurde abfiltriert, mit Wasser gewaschen und im Filtrat der Harnstoff bestimmt.

	Restharnstoff mg	Harnstoff in der Portion vor Versuch	Harnstoffspaltung Proz.
2. Ohne Saccharose .	24,4	24,7	0
3. Mit „ .	16,9	24,7	30,6

In 2 Tagen hat sich im Mycel eine gut wirkende Urease gebildet, welche den Harnstoff fast gänzlich zersetzt hat; der Harnstoff des Mycels war fast um das Fünffache im Vergleich zur Kontrolle gestiegen. In der Kultur mit Zugabe von 10 g Zucker waren nur 2,91 g ungenutzt geblieben, außerdem war viel Säure und Ammoniumoxalat entstanden. Längst bekannt ist dies aus den Versuchen von *C. Wehmer*[2]), sowie besonders aus den Untersuchungen von *W. Butkewitsch*[3]), der zeigte, daß, wenn man die Oxalsäure in der Kultur mittels Kreide neutralisiert, Aspergillus niger kein Ammoniak aus Aminosäuren bildet. Hieraus folgt, daß Aspergillus niger, wenn er auf Zucker wächst, das nicht nützliche Ammoniak in Form von Ammoniumoxalat ausscheiden kann; in Abwesenheit von Saccharose kann Oxalsäure nach *Wehmer* und *Butkewitsch* aus Eiweißstoffen entstehen, aber wahrscheinlich in ungenügender Menge, weil der Pilz das Ammoniak verwirft, indem er dasselbe teilweise in unschädlichen Harnstoff umwandelt. Charakteristisch ist, daß in diesem Falle die Pilze, im Sinne der Anpassung zur Entfernung des unnützen Stickstoffs, höher als niedere Tiere stehen, z. B. wie Actinia, welche ihren Stickstoff in Form von Ammoniumsalzen ausscheiden. Natürlich scheiden die Pilze ihren überschüssigen Stickstoff in Form von Harnstoff nur bei Abwesenheit von Kohlehydraten aus; der Harnstoff kann bei Zugabe von Saccharose von neuem durch den Organismus verbraucht werden. Hierin haben wir einen prinzipiellen Unterschied im Verhalten des Harnstoffs bei Pilzen und Tieren; bei letzteren kann derselbe, wie bekannt, unter keinen Umständen vom Organismus ausgenutzt werden.

In meiner vorigen Abhandlung[4]) schrieb ich, daß „der Pilzharnstoff in Abwesenheit von Kohlehydraten ein Abfallsprodukt, in Gegenwart derselben ein Nahrungsvorratsstoff ist, analog dem Asparagin und Glutamin“. Gegenwärtig geben die beschriebenen Versuche mit der Ausscheidung von Harnstoff in die Umgebung die Möglichkeit, diesen Harnstoff als Abfallsprodukt anzusehen, analog dem, was wir bei höheren Tieren beobachten. Selbstverständlich ist im Pflanzenorganismus die Frage nach den Abfalls-

[1]) Bei einer Wiederholung des Versuchs war der Harnstoff nach Zugabe von 10 g Saccharose nach 3 Tagen völlig verschwunden.

[2]) *C. Wehmer*, Bot. Zeitschr. **49**, 233, 1891.

[3]) *W. Butkewitsch*, Jahrb. f. wiss. Bot. **38**, 147, 1902.

[4]) *N. N. Iwanoff*, l. c.

produkten und Nahrungsstoffen komplizierter als bei Tieren. So erscheint z. B. bei letzteren die Kohlensäure stets als bedingungsloses Abfallsprodukt, bei der grünen Pflanze hingegen ist die Kohlensäure im Sonnenlichte ein Nahrungsstoff, im Dunkeln wird sie als Abfallsprodukt des Atmungsprozesses ausgeschieden. Eine ähnliche Ansicht können wir uns auch über den Harnstoff bei Pilzen bilden. Als neue Tatsache erscheint in den von mir beschriebenen Versuchen die Ausscheidung des Stickstoffs durch den Pilz in Form von Harnstoff, wozu derselbe durch die Bedingungen der Nahrung gezwungen wird, in diesem Falle durch Überschuß von Stickstoffmaterial.

Im weiter folgenden habe ich für meine Versuche noch drei Pilze ausgewählt und die Bildung von Harnstoff in denselben beobachtet. Zurzeit kultiviere ich eine große Menge Pilze, die sich in systematischer Hinsicht weit voneinander unterscheiden.

Versuche mit Penicillium glaucum.

Versuch 11.

Auf 10 ccm Gelatine mit Malzextrakt (500 ccm Wasser + 60 g Gelatine + 100 ccm Malzextraktlösung) wurde unter sterilen Bedingungen das Häutchen von *Penicillium glaucum* in *Petri*-Schale gezüchtet. Nach Verlauf von 8 Tagen wurde das Häutchen abgelöst, leicht mit Wasser gewaschen, getrocknet und in der verdünnten Gelatine und den Waschwässern der Harnstoff bestimmt. Im Filtrat war an Harnstoff vorhanden 7,63 mg, Trockengewicht des Mycelhäutchens 0,31 mg. Also 2,76 Proz. Harnstoff auf Trockengewicht.

Das Penicillium glaucum häuft auf stickstoffreichem Substrat auch merkliche Mengen Harnstoff an. Folgender Versuch wurde zum Vergleich des Nährsubstrats mit und ohne Saccharose angestellt.

Versuch 12.

In Petrischalen wurden gebracht: 1. 10 ccm Gelatine mit Malzextrakt; 2. desgleichen + 0,4 g Zucker. Sporen von Penicillium glaucum ausgesät. Entwicklung bei 15 bis 17°. Nach 10 Tagen wurden die Häutchen zweier Mycele, sowohl der ersten Serie ohne Saccharose, als auch der zweiten mit Saccharose, leicht mit Wasser gewaschen. In den Mycelen wurde das Trockengewicht und die Menge des Gesamtstickstoffs bestimmt, in der Kulturflüssigkeit der Harnstoffgehalt.

	Trockengewicht des Mycels g	Harnstoffmenge mg	Harnstoff auf Trockengewicht des Mycels Proz.
1. Ohne Saccharose .	0,43	10,9	2,54
2. Mit „ .	0,72	0	—

Es wurde dasselbe Resultat erzielt wie mit der Kultur von Aspergillus niger: auf Gelatine wurde Harnstoffbildung nur in Abwesenheit von Saccharose beobachtet.

Weiter wurde ein langdauernder Versuch mit einer Kultur von Penicillium glaucum auf Pepton angestellt.

Versuch 13.

In 100 ccm Kulturflüssigkeit (100 ccm Wasser, 0,1 g KH_2PO_4, 0,1 g $MgSO_4$, 3 g Pepton *Witte* + 1 mg $ZnSO_4$) wurde *Penicillium glaucum*

ausgesät. Temperatur 15 bis 17°. Nach Beendigung des Versuchs wurde das Mycelhäutchen abgelöst, leicht mit Wasser gewaschen, erst bei 33° getrocknet und eine Probe für die Urease entnommen, dann bei 110° getrocknet und für die Bestimmung von Stickstoff gewählt. In der Kulturflüssigkeit mit den Waschwässern wurde der Harnstoff bestimmt.

Das Mycel stellte kein ganzes Häutchen dar, sondern die Pilzmasse verbreitete sich inselweise.

Alter des Pilzes	Trockengewicht des Mycels	Harnstoffmenge in der Kulturflüssigkeit	Harnstoff auf Trockengewicht des Pilzes	Gesamt-N im Mycel	Harnstoff-N in der Flüssigkeit	Harnstoff-N zum Gesamt-N des Mycels
	g	mg	Proz.	mg	mg	Proz.
10 Tage . . .	0,322	16,98	5,24	27,62	7,93	28,7
18 „ . . .	0,328	28,4	8,66	27,69	13,26	47,8
25 „ . . .	0,250	38,27	14,51	17,73	17,86	100

Die Probe auf Urease im Mycel des Pilzes fiel negativ aus. Die Harnstoffmenge wuchs während der ganzen Zeit mit dem Alter der Kultur. Nach 25 Tagen Kultivierung hatte sich der Gesamtstickstoff im Mycel (17,73 mg) mit der Menge des in das Kulturmedium ausgeworfenen Harnstoffstickstoffs (17,86 mg) ausgeglichen. Charakteristisch ist, daß auch bei Penicillium glaucum das Mycel ebenfalls keinen Harnstoff enthält, letzterer ist nur in der Nährflüssigkeit vorhanden.

Dann züchtete ich noch zwei Kulturen von Rhizopus nigricans und Tieghemella orchidis, die sich ebenfalls als Harnstoffbildner erwiesen.

Versuche mit Rhizopus nigricans.

Versuch 14.

In Petrischalen wurden gebracht: 1. 10 ccm Gelatine mit Malzextrakt; 2. desgleichen + 0,5 g Saccharose ausgesät.

Rhizopus nigricans. Nach achttägiger Entwicklung, teils bei 16 bis 17°, teils bei 28°, wurde der Versuch beendet. Die Mycelhäutchen wurden leicht mit Wasser gewaschen; in den Mycelen wurde das Trockengewicht und der Gesamtstickstoff bestimmt, in der Kulturflüssigkeit der Harnstoffgehalt.

	Trockengewicht des Mycels	Harnstoffmenge in der Kulturflüssigkeit	Harnstoff auf Trockengewicht des Mycels
	g	mg	Proz.
1. Ohne Saccharose .	0,116	4,91	4,23
2. Mit 0,5 g „ .	0,360	0	—

In der ersten Kultur ohne Saccharose wurden im Mycel gefunden 14,39 mg Stickstoff, in das Kulturmedium waren vom Pilz ausgeschieden worden 2,29 mg Harnstoff-N, d. h. 15,9 Proz. des im Pilze enthaltenen Stickstoffs.

Versuch 15.

Wiederholung des Vorhergehenden, nur Zugabe von Malzextrakt und Nährsalzen zur Gelatine.

Rhizopus nigricans. 10 Tage bei 16°. *Kultur ohne Saccharose* in zwei Petrischalen.

Trockengewicht des Mycels g	Harnstoffmenge in der Kulturflüssigkeit mg	Harnstoff auf Trockengewicht des Mycels Proz.
0,321	18,2	5,67

Dasselbe Bild wie in den vorhergehenden Versuchen. Harnstoff wurde als Abfallsprodukt in der Kulturflüssigkeit bei Abwesenheit von Kohlehydrat gebildet.

Versuche mit Tieghemella orchidis.

Versuch 16.

In zwei Petrischalen wurden gebracht: 1. 10 ccm Gelatine mit Malzextrakt; 2. desgleichen + 0,5 g Saccharose mit *Tieghemella orchidis* besät.

Nach neuntägiger Entwicklung, teils bei 16 bis 17°, teils bei 28°, wurde der Versuch beendet. Die Mycelhäutchen wurden leicht mit Wasser gewaschen; in den Mycelen wurde das Trockengewicht und die Menge des Gesamtstickstoffs bestimmt, in der Kulturflüssigkeit der Harnstoffgehalt.

	Trockengewicht des Mycels g	Harnstoffmenge mg	Harnstoff auf Trockengewicht Proz.	Gesamt-N des Mycels mg	Harnstoff-N in der Kulturflüssigkeit mg	Proz. Harnstoff-N zum Gesamt-N mg
1. Ohne Saccharose	0,20	9,4	4,7	20,1	4,39	21,8
2. Mit 0,5 g „	0,58	0	—	49,7	0	—

Versuch 17.

Wiederholung des Vorigen, nur mit Zugabe von Malzextrakt und Nährsalzen zur Gelatine.

Tieghemella orchidis. 10 Tage bei 16°. Kultur *ohne Saccharose* in zwei Petrischalen.

Trockengewicht des Mycels g	Harnstoff mg	Harnstoff auf Trockengewicht Proz.
0,232	19,42	8,37

Die Versuche mit Tieghemella bestätigen die auch bei anderen Pilzen erhaltenen Ergebnisse.

Die willkürlich gewählten Pilze gehören verschiedenen Klassen an: Aspergillus niger und Penicillium glaucum zu Ascomyceten (Ascomycetes), Rhizopus nigricans und Tieghemella orchidis zu den Zygomyceten (Zygomycetes), und der Champignon, welcher in reiner Kultur Harnstoff ergab, zu den höheren Basidiomyceten (Basidiomycetes). Ich züchte reine Kulturen von verschiedenen Pilzen auf Gelatine und hege die Erwartung, daß dieselben ebenfalls Harnstoff anhäufen werden. Aber sogar jetzt schon kann ich die Annahme machen, daß die Bildung vom Harnstoff als Abfallsprodukt eine allgemeine Eigenschaft der Pilze ist; *die Anwesenheit von Harnstoff im Pilze charakterisiert nicht den Pilz selbst, sondern dessen Nahrungsbedingungen.* Wir sahen, daß eine reiche stickstoffhaltige Nahrung (Gelatine, Pepton) einerseits und die Abwesenheit (oder unbedeutend kleine Mengen, welche im Malzextrakt enthalten sind) von Kohlenhydraten andererseits als notwendige Bedingungen für die Harnstoffbildung erscheinen. Bei

normalen Verhältnissen leiden solche Pilze, wie Aspergillus niger und Penicillium glaucum, keinen Mangel an Kohlenstoffnahrung, und darum gelingt es nicht, den Harnstoff zu entdecken. Diese Pilze häufen Oxalsäure an, welche das Restammoniak bindet. Im Falle einer Entwicklung auf reichen stickstoffhaltigen Substanzen entsteht die Oxalsäure aus Aminosäuren und diese bindet das sich bei deren Desaminierung ausscheidende Ammoniak; in solchen Kulturen finden wir eine große Menge Ammoniumsalze vor. Aber bei Mangel an Kohlenstoffnahrung, bei langdauernder Kultur beginnt der Pilz, ein wahrscheinlich sogar in energetischer Beziehung stark minderwertiges Material, wie Oxalsäure, zu verbrauchen. Im Endverlauf dieses Prozesses muß das Ammoniak mit Kohlensäure gebunden werden, aber nicht zu dem für den Pilz schädlichen Ammoniumcarbonat, sondern zum neutralen Harnstoff. Letzterer wird aus dem Pilzkörper in die umgebende Flüssigkeit entfernt und erscheint als Abfallsprodukt schon deshalb, weil der Pilz des harnstoffspaltenden Ferments — der Urease — völlig beraubt ist.

Die von mir beobachtete Ausscheidung des Harnstoffs aus dem Pilze als Abfallsprodukt gibt mir die Möglichkeit, die Fragen nach der Stickstoffnahrung der mycotrophen Pflanzen aufzuklären. Vielleicht scheiden die auf Wurzeln lebenden Pilze Harnstoff aus und versorgen mit demselben die höhere Pflanze; es ist die weitere Annahme denkbar, daß die Wurzelzellen darum Stickstoff erhalten, weil die Pilze Mangel an Kohlehydratnahrung leiden. Diese Erwägung hat ihren Grund schon darin, daß *H. Weyland*[1]) bei vielen obligaten Mycotrophen und Orchideen die Bildung von Harnstoff beobachtet hat. Dieser Autor fand denselben nicht bei der Eller und bei Leguminosen vor, welche kleine Knollen besitzen, statt dessen gelang es ihm aber, in denselben große Mengen von Ammoniumsalzen festzustellen, welche nur unter der Einwirkung von Urease aus den Wurzeln der höheren Pflanzen gebildet werden konnten; längst bekannt ist[2]), daß die Knollen der Leguminosen reichlich mit diesem Ferment versorgt sind. Was aber die Urease betrifft, so charakterisiert ihre Abwesenheit oder Anwesenheit gar nicht den gegebenen Pilz, sondern die Nahrungsbedingungen, oder genauer gesagt, das Verhältnis zwischen den Stickstoff- und Kohlenstoffquellen, auf deren Kosten der Organismus lebt. Auf reichem stickstoffhaltigen Substrat, in Abwesenheit von Kohlehydraten, verschwindet die Urease bei Aspergillus niger, erscheint aber wieder, wenn man der Kultur Saccharose zufügt. Aber die alleinige Anwesenheit des Kohlehydrats bedingt nicht die bestimmte Entwicklung der Urease in der Kultur, wo als begrenzender Faktor des Pilzwachstums der Mangel an Stickstoffnahrung erscheint; nur gleichzeitige Anwesenheit dieser beiden Quellen ergibt die Möglichkeit, eine gute Arbeit der Urease zu beobachten. Indem wir bald die Abwesenheit, bald das Auftreten der Urease in ein und derselben Kultur konstatieren, können wir schneller zum Verständnis ihrer Bedeutung für den Pflanzenorganismus gelangen. Wir verstehen den Sinn des Verschwindens der Urease zu einer Zeit, wo der Pilz gezwungen ist, Harnstoff zu bilden und auszuscheiden, aber uns ist ganz unklar, warum, in Gegenwart von Kohlehydrat- und Stickstoffquellen für die Nahrung, die Urease in die Erscheinung tritt; und desto mehr unklar ist vorläufig die Rolle der

---

[1]) *H. Weyland*, Jahrb. f. wiss. Bot. **51**, 1, 1912.

[2]) *H. E. Armstrong*, Ann. of Botany **25**, April 1911; Nature, Oktober 1923; *E. A. Werner*, Nature, 1923.

Urease bei höheren Pflanzen. *Fosse*[1]), der bei der Oxydation von Formaldehyd durch Permanganat in Gegenwart von Ammoniak große Mengen Harnstoff und als Zwischenprodukt dieser Oxydation die Cyansäure erhielt, stellte die Hypothese auf, daß auch bei den natürlichen Verhältnissen der Photosynthese das erste Assimilationsprodukt des Kohlenstoffs — der Formaldehyd — sich mit Ammoniak vereinige und über die Cyansäure in Harnstoff übergehe. Diese Hypothese weist der Anwesenheit der Urease in der Pflanzenzelle eine große Rolle zu, nämlich dieses Ferment soll, nach *Fosse*, den Harnstoff, eine zur Assimilation untaugliche Substanz, in zwei Nährstoffe, Ammoniak und Kohlensäure, umwandeln. *E. A. Werner*[2]) schreibt dem Harnstoff im Chemismus der Pflanzenzelle auch eine große Rolle zu; dieser Autor nimmt an, daß der Harnstoff stets als Endprodukt des Eiweißzerfalls gebildet wird und nur darum nicht angehäuft wird, weil in den Pflanzen die Eiweißsynthese vorwiegend ist.

Fosse begründet seine Hypothese mit der Feststellung von Harnstoff bei vielen grünen Pflanzen, obgleich in sehr kleinen Mengen. Meine Versuche über die Bildung und Ausscheidung von Harnstoff in Pilzen können den Gedanken über die große Bedeutung des Harnstoffs bestätigen. Wir müssen nicht vergessen, daß in den grünen Pflanzen die Anhäufung von Asparagin oder Glutamin stattfindet, die zu solchen Momenten in denselben erscheinen, wo in den Pilzen Harnstoff auftritt, d. h. bei Überschuß von Stickstoff und Mangel an Kohlehydraten. Hier sind vergleichende physiologische Versuche nötig, die uns die Rolle des Harnstoffs und der Urease bei höheren Pflanzen erklären könnten. Die Tatsache aber, daß der Harnstoff als eine gute Quelle der Stickstoffnahrung erscheint, ist schon längst bekannt (*G. Ville*, *Lutz*, *Czapek*, *Mazé*, *P. Thomas*), aber in letzter Zeit haben *Truffaut* und *Bezssonoff*[3]) gezeigt, daß der Harnstoff als ein ideales stickstoffhaltiges Nahrungsprodukt für höhere Pflanzen erscheint.

Meine Versuche über die Bildung und die Umwandlung von Harnstoff in Pilzen unter den Laboratoriumsbedingungen versprechen, vieles im Chemismus der Harnstoffentstehung aufzuklären. Außerdem müssen noch inbetreff der Harnstoffbildung unter passenden Bedingungen Hefen und Bakterien untersucht werden. Alle diese Probleme sind für mich von großem Interesse, und gegenwärtig stelle ich ergänzende Versuche an.

Schlüsse.

1. Die in reiner Kultur gezüchteten Pilze können Harnstoff auf reichem stickstoffhaltigen Substrat bilden. Die Anwesenheit des Harnstoffs charakterisiert nicht den Pilz selbst, sondern die Bedingungen der Nahrung desselben.

2. Der gebildete Harnstoff bleibt nicht im Mycel des Pilzes zurück, sondern wird von demselben als Abfallsprodukt in die Umgebung ausgeschieden.

3. In ein und derselben Kultur eines Pilzes kann die Urease bald erscheinen, bald verschwinden, je nach dem Verhältnis zwischen den Produkten der Stickstoff- und der Kohlenstoffnahrung.

[1]) *R. Fosse*, Ann. de l'Institut Pasteur **30**, 1, 1916.

[2]) *E. A. Werner*, Dubl. Journ. of med. sciences **4**, 519, 1922; The Chemistry of Urea. London 1923.

[3]) *Truffaut* et *Bezssonoff*, La Science du Sol **3**, 3, 1924.

Über Kalkbindung durch tierische Gewebe. XI.

Von

Th. Brehme und **P. György.**

(Aus der Heidelberger Kinderklinik.)

(Eingegangen am 4. Februar 1925.)

In einer früheren Mitteilung[1]) haben *Freudenberg* und der eine von uns (*György*) den Versuch unternommen, die in früheren zahlreichen Modellversuchen gewonnenen Ergebnisse über Kalkbindung durch Eiweißkörper und durch tierische Gewebe auf die physiologische und pathologische Verkalkung sowie auch auf den Verknöcherungsprozeß zu übertragen. Während in den früheren Theorien das ganze Phänomen vorwiegend oder auch allein nur von der physikalischen Seite als ein Löslichkeitsproblem betrachtet wurde, gehen *Freudenberg* und *György* von der Annahme einer, wenn auch zum Teil vorübergehenden, Kalkbindung an die eiweißhaltige Grundsubstanz aus. Seit den erwähnten Veröffentlichungen haben sich mehrere Autoren dieser Betrachtungsweise im Prinzip angeschlossen (*Eden* und Mitarbeiter, *Rabl*, *Weidenreich*). Die Verkalkung vollzieht sich in drei immer wiederholten Stufen:

1. Bindung von Ca-Ionen an die organische Grundsubstanz.
2. Bindung von Phosphat- bzw. Hydrocarbonationen aus der umgebenden Lymphe, so daß eine Calcium-Phosphat- bzw. Carbonat-Eiweißverbindung entsteht.
3. Abspaltung von Calciumphosphat und Carbonat und Freiwerden der kalkbindenden Gruppen in der Grundsubstanz.

Der unter 1. bezeichnete Vorgang deckt sich dem Sinne nach mit der von *Pfaundler* postulierten und auch experimentell untersuchten Ca-Adsorption, die nach dem gleichen Autor die Verkalkung stets einleiten soll. *Freudenberg* und der eine von uns (*György*) haben aber den Beweis zu erbringen vermocht, daß es sich auch in diesem Punkte

[1]) Diese Zeitschr. **142**, 1923; vgl. auch Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **24**, 1923.

nicht um die Resultante des rein physikalischen Adsorptionsphänomens, sondern um die Wirkung chemischer Valenzkräfte handelt, wie es in der letzten Zeit besonders von *Loeb* für die Metall-Eiweißverbindungen angenommen wird.

Die physiko-chemischen Bedingungen der Kalkbindung im Organismus sind zum Teil stets vorhanden. Wenn sie trotzdem nicht zustande kommt, so müssen wohl Hemmungsmechanismen im Spiele sein. Als solche haben *Freudenberg* und der eine von uns (*György*) auf Grund ihrer Modellversuche den Zellstoffwechsel bzw. die Produkte der Zelltätigkeit bezeichnet. Erst eine Störung im Zelleben der verknöchernden Gewebe kann den Anstoß zur Verkalkung (Verknöcherung) geben.

Die Annahme hochgradiger örtlicher Stoffwechselstörungen als wesentlichste auslösende Ursache der enchondralen Verknöcherung, wie auch aller Verknöcherungsvorgänge wird auch von histologischer Seite neuerdings stark betont (so *Eckert-Möbius*). Ein völliger Niedergang der Zellen ist dabei keinesfalls erforderlich (*Weidenreich*).

Ein wichtiger möglicher Einwand fand bis jetzt in den Untersuchungen *Freudenbergs* und *Györgys* keine experimentelle Bearbeitung. Man könnte nämlich die Frage aufwerfen: ist denn die Natur der kalkbindenden Eiweißkörper für das Ausmaß dieser Bindung ohne Bedeutung bzw. hängt die Ca-Anlagerung allein vom Milieu ab? (H-Ionenkonzentration, Anionenwirkung, Stoffwechselprodukte)[1]). Diese Frage erheischt um so mehr eine Beantwortung, als ihr in der freilich nur hypothetischen sogenannten „Metaplasie", d. h. in einer spezifischen Abänderung der Grundsubstanz der provisorischen Verkalkungszone bei der physiologischen enchondralen Ossifikation ein histologisches Korrelat entspricht. Man könnte dann mit der Möglichkeit rechnen, daß infolge der Metaplasie die Kalkavidität der eiweißhaltigen Grundsubstanz gewaltig erhöht wird. Diese Möglichkeit haben *Freudenberg* und der eine von uns (*György*) ausdrücklich offen gelassen, wenn sie auch ihre Entbehrlichkeit wenigstens für die dystrophische Verkalkung zugeben mußten.

Von diesem Gesichtspunkt aus unterzog nun der eine von uns (*György*) die ungleiche Ca-Verteilung zwischen Blutkörperchen und Serum einer näheren Analyse. Er kam gleichzeitig und unabhängig von *Rona, Petow* und *Wittkower* zu dem Schluß, daß für die Erklärung der Tatsache, daß sich in den Blutkörperchen viel weniger Ca findet als im Serum, die Annahme einer für Ca undurchdringlichen Zellmembran nicht notwendig ist, sondern dafür vielmehr die physikalisch-

[1]) Vgl. die früheren Mitteilungen in dieser Zeitschr. **110**, **115**, **121**, **124**, **129**.

chemischen Unterschiede der Zell- (Hämoglobin) und der Serum- (Albumin, Globulin) Eiweißkörper in Betracht zu ziehen sind. Der isoelektrische Punkt des Hämoglobins liegt vielmehr im alkalischen Bereich als der der Serumeiweißkörper. Möglicherweise steht die erwähnte ungleiche Kalkverteilung mit dieser Eigenschaft der Eiweißkörper in Beziehung. Ließen nun *Rona*, *Petow* und *Wittkower* verschiedene Eiweißkörper aber mit dem gleichen isoelektrischen Punkt dialysieren, so kam es in der Tat zu keiner ungleichen Kalkverteilung. Übertragen wir nun diese Versuchsergebnisse auf das Ossifikationsproblem, so müßte der isoelektrische Punkt der verkalkenden Gewebe stärker im sauren Bereich liegen als der der Serumeiweißkörper. Es fragt sich nun, ob dieses Postulat wenigstens im Modellversuch sich tatsächlich beweisen läßt. Als Eiweißkörper mit besonders niedrigem isoelektrischen Punkt kennen wir die Nucleinsäuren[1]).

Wir ließen nun eine 4proz. Lösung von Natrium nucleinicum aus Hefe[2]) (*Merck*) gegen Serum bzw. gegen destilliertes Wasser oder eine in ihrem Kalkgehalt wechselnde Dialysierflüssigkeit[3]) dialysieren. Die im Anhang beigefügten Versuche bestätigten vollauf unser Postulat. Eine Lösung von Natrium nucleinicum vermag außerordentlich stark Kalk zu binden. Besonders deutlich tritt diese Kalkavidität in den Dialyseversuchen gegen Serum zutage; das Serum verliert stark an Kalk, es kommt zu einer ungleichen Verteilung zugunsten der Nucleinlösung. Dies ist um so auffallender, als der Kalk des Serums bekanntlich ebenfalls zum Teil an die Eiweißkörper gebunden ist. Mit diesem Anteil erhöht sich dann der Kalküberschuß in der Lösung von Natrium nucleinicum.

Konzentrationsunterschiede können für den Ausfall der Versuche nicht beschuldigt werden:

N-Gehalt im Serum 1,19 g-Proz.

N-Gehalt in der Lösung von Natrium nucleinicum 0,84 g-Proz.

[1]) Vgl. *Schade*, Die physikal. Chem. in d. Med. Dresden 1921.

[2]) Nicht ganz kalkrein, vgl. Anhang. Das Flockungsoptimum lag zwischen $p_H = 2,0$ bis 3,0.

[3]) Die Dialysierflüssigkeit wurde von *Greenwald* zu Dialysierversuchen mit Serum angegeben und könnte gewissermaßen als eine anorganische Serumlösung gelten. Sie besteht aus:

$NaHCO_3$	2,52 g
KH_2PO_4	3,2 ccm m/5
$MgCl_2$	0,053 g
KCl	0,296 g
NaCl	6,26
Aqua dest. . . . . . . ad	1000 g

Dazu kommt noch der jeweils wechselnde Ca-Zusatz in Form von $CaCl_2$.

Wenn auch die Versuche nicht alle mit dem hier analysierten Serum ausgeführt wurden, so sehen wir aus der Stickstoffzahl der Nucleinlösung (auf Eiweiß umgerechnet 5,25 Proz.), daß der Eiweißgehalt der Sera wohl stets über dieser Zahl liegen mußte. Würde eine ungleiche Ca-Verteilung, allein die Folge von Konzentrationsunterschieden, in den gegenseitig dialysierten Eiweißlösungen beruhen, so müßte eine Kalkanhäufung eher auf der Seite des Serums und nicht — wie regelmäßig gefunden — auf der Seite der Nucleinlösung zustande kommen.

Unsere Modellversuche durften wir also in dem Sinne auffassen, daß eine Kalkbindung durch die Gewebe überall dort erfolgen kann, wo der Charakter der kalkbindenden Eiweißkörper in demselben Verhältnis zu dem der Eiweißkörper in der umspülenden Gewebsflüssigkeit steht wie das Natrium nucleinicum zu den Serumeiweißkörpern; der isoelektrische Punkt muß bei den Gewebeeiweißkörpern niedriger liegen als bei den Eiweißkörpern der umspülenden Flüssigkeit. Die weiteren bekannten Bedingungen (H-Ionenkonzentration, Hemmung durch Stoffwechselprodukte usw.) müssen freilich stets berücksichtigt werden.

Besonders überzeugend wirken die Versuche 17 bis 20, bei denen Natrium nucleinicum, Serum und Hämoglobin gleichzeitig (im gleichen Gefäß) gegen eine kalkhaltige Dialysierflüssigkeit dialysierten. Die stärkste Bindung finden wir beim Natrium nucleinicum, eine viel schwächere beim Serum und keine Bindung beim Hämoglobin.

Wenn nun nach neueren Untersuchungen von *Csapo* und *Faubl*[1] auch die Serumeiweißkörper in ihren verschiedenen Fraktionen einen verschiedenen Kalkgehalt aufweisen, so dürften diese Befunde durch die Untersuchungen von *Rona, Petow* und *Wittkower*, sowie von *György* und auch nach den vorliegenden Versuchen eine gewisse Klärung erfahren haben. Der isoelektrische Punkt des Albumins liegt bei $p_H = 4{,}8$, der des Globulins bei 5,4, der des Fibrins bei 7,0. So entspricht es nur unserem Postulat, daß der Kalkgehalt dieser Fraktionen in der gleichen Reihenfolge abnimmt, wie das *Csapo* und *Faubl* nachweisen konnten.

Wieweit nun die hier skizzierten Anschauungen auf das Verkalkungsproblem und so auch betreffs der Frage der Metaplasie anwendbar sind, läßt sich zunächst mangels direkten Beweismaterials nicht entscheiden. Die Möglichkeit ist jedenfalls gegeben, und so dürfte dem Charakter sowie den physikalisch-chemischen Eigenschaften der verkalkenden Eiweißkörper ein erhöhtes Augenmerk zugewendet werden, bei voller Wahrung der von *Freudenberg* und dem einen von uns (*György*) näher analysierten weiteren Bedingungen[2].

[1]) Diese Zeitschr. **150**, 1924.

[2]) Daß der Charakter der Eiweißkörper z. B. das Sekretionsprodukt der Osteoblasten als ein aktiver Verkalkungsfaktor aufzufassen sei, betont auch *Weidenreich*, Zeitschr. f. Anatomie u. Entw. **69**, 1923.

Ein weiterer länger bekannter Befund aus der Zellchemie scheint uns dagegen schon auf Grund der hier mitgeteilten Versuchsergebnisse einer Klärung nähergerückt zu sein. Wir meinen die Kalkverteilung innerhalb der Zelle. Die zellulären Elemente sind im allgemeinen kalkarm. Der wenige Kalk ist, wie sich das histochemisch nachweisen läßt, an die Kernsubstanz gebunden (*Macallum*). Die letztere besteht aber hauptsächlich eben aus Nucleinsäuren, deren besondere Kalkavidität wir in der vorliegenden Arbeit zu beweisen in der Lage waren. Bei erhöhter Zelltätigkeit kann die Kernsubstanz ihren Kalk an das interzellulare Gewebe abgeben (*Watermann*, *Gans*). Diese Entbindung von Kalk beruht entweder auf einer besonderen Beeinflussung der Kernsubstanz selbst oder aber — entsprechend den früheren Arbeiten *Freudenbergs* und des einen von uns (*György*) — einer Hemmung der Kalkanlagerung an die Kerneiweißkörper durch Stoffwechselprodukte. Wir glauben nicht fehlzugehen, wenn wir in der intrazellulären Kalkverteilung eine besondere Stütze für die biologische Anwendungsfähigkeit unserer Modellversuche erblicken.

Mit Hilfe der Kompensationsdialyse berechnen *Rona* und *Takahashi*[1]) den indiffusiblen, höchstwahrscheinlich an die Serumeiweißkörper gebundenen Kalkanteil auf etwa 35 bis 40 Proz. des Gesamtkalkes. Im Besitz dieser Daten wären wir in der Lage, in unserem Dialysiersystem: Serum gegen Nucleinsäure, die Menge des an die Nucleinsäure fest gebundenen Kalkes zu ermitteln, wenn wir nur von den Gesamtkalkzahlen den an das Serum gebundenen Kalk nach der *Rona*schen Angabe in Abzug bringen. Es fragt sich aber, ob dieses Vorgehen erlaubt ist und ob nicht vielmehr der indiffusible Kalkanteil des Serumkalkes wie auch überhaupt der an Eiweißkörper gebundene Kalk in keinem stabilen, sondern in einem nur labilen Gleichgewicht steht und als solcher unter anderem von der Menge und dem Charakter der Eiweißkörper, der übrigen gleichzeitig gelösten Serumbestandteile, wie auch von der Gesamtmenge des Kalkgehalts abhängt. Diese Frage erscheint uns um so wichtiger, als nach der Angabe von *Cruickshank* bei der parathyreopriven Tetanie der Hunde der indiffusible Kalkanteil im Serum bei der gleichzeitig vorhandenen Hypocalcämie auf ein Minimum herabgesetzt ist und weil nach *Salvesen* die bei Nephritiden oft auftretende Senkung des Gesamtserumkalkspiegels auf die Eiweißverarmung des Serums und somit ebenfalls auf eine Erniedrigung des indiffusiblen Kalkanteils zurückzuführen sei.

Zur Beantwortung der Frage stellten wir Versuche mit gewöhnlicher Kompensationsdialyse an. Serum von Tieren sowie von gesunden

---

[1]) Diese Zeitschr. **31**, **49**, 1913.

und kranken Menschen haben wir gegen die in ihrem Kalkgehalt wechselnde *Greenwald*sche Salzlösung dialysiert. Die im Anhang zusammengestellten Versuche führen zu dem Schluß, daß unter den gegebenen Bedingungen der an die Serumkörper gebundene indiffusible Kalkanteil in seiner Größenordnung vom Gesamtkalkgehalt des Dialysiersystems abhängt: Bei hohem Kalkgehalt wird mehr, bei niedrigem Kalkgehalt weniger Kalk durch die Eiweißkörper festgehalten.

Rechnen wir die in der Literatur bekannten Dialysierversuche von *Rona* und *Takahashi* (l. c.), *Rona*, *Haurowitz* und *Petow*[1]), sowie von *v. Meysenbug*, *Pappenheimer*, *Zucker* und *Murray*[2]) von diesem Gesichtspunkt aus durch, so finden wir unsere eigenen Versuche vollauf bestätigt (vgl. auch Anhang). Den erwähnten Autoren scheint diese Gesetzmäßigkeit entgangen zu sein. Auf Grund dieser Ergebnisse läßt sich die von uns aufgestellte Frage in dem Sinne beantworten, daß der an die Eiweißkörper gebundene Kalkanteil keine konstante Größe ist, sondern zumindest vom Gesamtkalkgehalt abhängig erscheint. Im Besitz dieser Schlußfolgerung läßt sich die Kalkverteilung im Dialysiersystem: Serum gegen Nucleinsäure allein mit Hilfe der Gesamtkalkzahlen nicht genau feststellen, da wir nicht wissen, wieviel Kalk durch die Serumeiweißkörper und wieviel durch die Nucleinsäure fest belegt ist. Weiterhin beleuchten diese Untersuchungen die prinzipielle Richtigkeit der von *Rona* und *Michaelis* inaugurierten Kompensationsdialyse. Steht das Serum mit einer Kalklösung so im Gleichgewicht, daß auch nach längerer Dialysedauer eine Kalkverschiebung sich nicht nachweisen läßt, so ist wohl anzunehmen, daß in diesem Falle der Kalkgehalt der Dialysierflüssigkeit mit dem diffusiblen Anteil des Serumkalkes identisch ist, woraus wir dann auch den indiffusiblen Anteil leicht berechnen können. Bei niedrigerem oder höherem Kalkgehalt in der Dialysierflüssigkeit tritt eine Störung in der Kalkverteilung infolge erhöhter Bindung oder Entbindung ein.

Aus den noch nicht sehr zahlreichen Versuchen mit Tetanieserum (idiopathische Säuglingstetanie) geht klar hervor, daß die Serumeiweißkörper auch in diesem Zustande Kalk zu binden vermögen. Im Gegensatz zu *Cruickshank* entsprechen somit unsere Versuchsergebnisse denen von *v. Meysenbug* und *Mac Cann*[2]), deren Versuche sich übrigens allein auf die parathyreoprive Tetanie der Hunde beziehen. Die zunächst noch nicht genügende Anzahl unserer Versuche mit Tetanieserum beabsichtigen wir durch weitere zu ergänzen und unsere Ergebnisse durch die Ultrafiltrationsmethode zu kontrollieren.

---

[1]) Diese Zeitschr. **149**, 1924.
[2]) Journ. of biol. Chem. **47**, 1921.

Im vorstehenden haben wir eine ungleiche Kalkverteilung implizite auf eine Kalkbindung durch die Eiweißkörper zurückgeführt. Wenn wir uns nun aber wiederum an das Beispiel der Kalkverteilung im Blute erinnern, so sehen wir, daß wir mit diesem einfachen Mechanismus für das in Frage stehende Problem nicht auskommen können, denn im Blute finden wir oft 9 bis 10 mg-Proz. Serum-Ca gegen 1 bis 2 mg-Proz. Ca in den Erythrocyten. Daraus würde sich eine indiffusible Kalkmenge im Serum von 8 bis 9 mg-Proz. ergeben, was aber durch die Kompensationsdialyse nicht bestätigt werden kann. Neben der Bindung müssen hier noch andere Mechanismen im Spiele sein, so hauptsächlich das bekannte *Donnan*sche Prinzip[1]). Auch für die anderen Beispiele der ungleichen Kalkverteilung, die wir bis jetzt im allgemeinen mit dem Sammelnamen Kalkbindung bezeichnet haben, dürfte das *Donnan*sche Gleichgewicht zum Teil berücksichtigt werden.

Zusammenfassung.

1. Für das Ausmaß der Kalkbindung ist neben den bekannten äußeren Bedingungen (H-Ionenkonzentration, Anionenwirkung, Stoffwechselprodukte) auch der Charakter der kalkbindenden Eiweißkörper in Betracht zu ziehen.

2. Je höher der isoelektrische Punkt im sauren Bereich liegt, desto größer ist die Kalkavidität dieser Eiweißkörper. Sie nimmt in folgender absteigender Reihe ab:

Nucleinsäure — Albumin — Globulin — Fibrin — Hämoglobin. Diese Reihe dürfte durch weitere, noch nicht untersuchte Eiweißkörper noch ergänzt werden können.

3. Die bekannte ungleiche intrazelluläre Kalkverteilung, d. h. der Kalkreichtum der Kernsubstanz, erklärt sich durch die besondere Kalkaffinität der den Kern bildenden Eiweißkörper.

4. Wieweit die für den Verknöcherungsprozeß angenommene hypothetische „Metaplasie“ mit diesen Erscheinungen in Beziehung steht, läßt sich zunächst mangels direkten experimentellen Materials nicht exakt beweisen.

5. Die Kalkbildung ist weiterhin vom Gesamtkalkgehalt abhängig. Dieser Satz bleibt auch für das Serum gültig, womit das Prinzip der Kompensationsdialyse eine weitere Stütze erhält.

6. Auch bei der idiopathischen Tetanie der Säuglinge läßt sich trotz Hypocalcämie durch Analyse eine Kalkbindung nachweisen.

7. Für die ungleiche Kalkverteilung ist neben der Kalkavidität der Eiweißkörper auch das Donnangleichgewicht zu berücksichtigen.

---

[1]) Vgl. auch *Rona* und *György*, diese Zeitschr. 56, 1913.

Anhang[1]).

1. Versuch.

4proz. Na-nucleinicum-Lösung gegen eine eiweißfreie Salzlösung (nach *Greenwald*). Dauer der Dialyse 5 Stunden.

Nr.	Vor der Dialyse				Nach der Dialyse				Undialysabler Kalk	
	Salzlösung		Nucleinlösung		Salzlösung		Nucleinlösung			
	Gesamt-volum.	Ca mg-Proz.	Gesamt-volum.	Ca mg-Proz.	Gesamt-volum.	Ca mg-Proz.	Gesamt-volum.	Ca mg-Proz.	mg-Proz.	Proz. d. Gesamt-kalkes
1	5,0	0	5,0	5,5	3,5	1,6	6,2	3,8	2,7	49
2	5,0	4,7	5,0	5,5	3,5	3,8	6,4	6,0	2,8	51
3	5,0	6,5	5,0	5,5	3,4	2,8	6,6	7,6	6,3	114

2. Versuch.

4proz. Na-nucleinicum-Lösung gegen eine eiweißfreie Salzlösung (nach *Greenwald*). Dauer der Dialyse 5 Stunden.

Nr.	Vor der Dialyse				Nach der Dialyse				Undialysabler Kalk	
	Salzlösung		Nucleinlösung		Salzlösung		Nucleinlösung			
	Gesamt-volum.	Ca mg-Proz.	Gesamt-volum.	Ca mg-Proz.	Gesamt-volum.	Ca mg-Proz.	Gesamt-volum.	Ca mg-Proz.	mg-Proz.	Proz. d. Gesamt-kalkes
1	5,0	—*)	8,0	5,4	2,1	1,3	10,75	4,0	3,6	66,6
2	5,0	4,7	8,0	5,4	4,0	3,3	8,9	6,0	3,0	55,5
3	5,0	6,5	8,0	5,4	3,85	2,0	9,0	8,4	7,2	133

*) Statt der *Greenwald*schen Dialysierflüssigkeit Aqua dest.

3. bis 16. Versuch.

Serum gegen Na-nucleinicum.

Nr.	Vor der Dialyse				Nach der Dialyse			
	Serum		Nuclein-lösung		Serum		Nuclein-lösung	
	Gesamt-volumen	Ca mg-Proz.	Gesamt-volumen	Ca mg-Proz.	Gesamt-volumen	Ca mg-Proz.	Gesamt-volumen	Ca mg-Proz.
3	5,0	10,0	5,0	7,8	5,4	7,0	4,6	10,7
4	5,0	11,6	6,0	5,8	5,4	6,7	5,6	9,1
5	5,0	10,8	7,0	5,8	5,2	6,3	6,8	8,0
6	5,0	10,6	8,0	5,8	5,25	8,6	7,15	7,3
7	5,0	9,5	8,0	5,8	5,1	6,2	7,9	7,6
8	5,0	9,5	8,0	5,8	5,3	5,9	7,7	7,3
9	5,0	10,6	8,0	5,8	5,35	6,8	7,65	8,6

Nr.	Vor der Dialyse				Nach der Dialyse			
	Serum		Nuclein-lösung		Serum		Nuclein-lösung	
	Gesamt-volumen	Ca mg-Proz.	Gesamt-volumen	Ca mg-Proz.	Gesamt-volumen	Ca mg-Proz.	Gesamt-volumen	Ca mg-Proz.
10	5,0	10,6	8,0	5,8	5,8	6,7	7,2	8,2
11	5,0	5,9*)	8,0	4,6	5,1	4,6	7,8	5,8
12	5,0	9,4	8,0	4,6	5,15	5,2	7,85	6,8
13	5,0	9,9	8,0	4,6	6,0	5,9	7,15	7,8
14	5,0	9,4	8,0	5,7	4,85	5,1	7,75	8,1
15	5,0	9,5	8,0	5,7	4,8	5,2	8,0	7,4
16	5,0	9,6	8,0	5,7	5,5	6,4	7,6	8,3

*) Tetanie!

[1]) Die Ca-Bestimmungen erfolgten nach *Kramer-Tisdall*.

17. bis 20. Versuch.

Kombinierte Dialyse von Serum, Na-nucleinicum und Hämoglobin gegen eine Salzlösung.

Nr.	Vor der Dialyse							
	Serum		Nucleinlösung		Hämoglobinlösung *)		Salzlösung	
	Volumen ccm	Ca mg-Proz.	Volumen ccm	Ca mg-Proz.	Volumen ccm	Ca mg-Proz.	Volumen ccm	Ca mg.-Proz.
17	2,0	9,2	2,0	5,8	5,0	0,8	30,0	8,8
18	5,0	7,8**)	5,0	5,2	10,0	0,9	30,0	8,8
19	5,0	7,8**)	5,0	5,2	5,0	0,9	30,0	6,5
20	10,0	10,5	10,0	5,2	10,0	0,9	60,0	8,6

*) Lösliches Hämoglobin (*Merck*) in einer 4proz. Lösung. — **) Schweineserum (leicht hämolytisch).

Nr.	Nach der Dialyse										
	Serum			Nucleinlösung			Hämoglobinlösung			Salzlösung	
	Volumen ccm	Ca mg-Proz.	davon undialysabel Proz.	Volumen ccm	Ca mg-Proz.	davon undialysabel Proz.	Volumen ccm	Ca mg-Proz.	davon undialysabel Proz.	Volumen ccm	Ca mg-Proz.
17	3,0	10,8	66	4,0	13,8	245(!)	5,5	6,6	—	26,0	6,7
18	6,0	7,2	33	6,3	11,5	158	11,8	5,3	—	25,0	5,0
19	5,75	7,8	43	7,0	9,4	123	5,6	4,8	—	25,8	4,8
20	10,75	11,4	50	11,2	12,1	121	11,6	5,5	—	55,35	6,5

21. Versuch.

Serum gegen Salzlösungen mit variiertem Ca-Gehalt.

Nr.	Vor der Dialyse				Nach der Dialyse				Undialysabler Kalk	
	Salzlösung		Serum		Salzlösung		Serum			
	Volumen ccm	Ca mg-Proz.	Volumen ccm	Ca mg-Proz.	Volumen ccm	Ca mg-Proz.	Volumen ccm	Ca mg-Proz.	mg-Proz.	Proz. des Gesamtkalkes
1	8,0	—	5,0	9,2	6,85	3,0	6,0	5,2	2,6	28
2	8,0	6,5	5,0	9,2	6,85	6,0	6,0	9,4	4,1	42
3	8,0	8,8	5,0	9,2	7,35	6,7	5,4	10,9	4,6	50

22. Versuch.

Serum gegen Salzlösungen mit variiertem Ca-Gehalt.

1	8,0	—	5,0	9,6	6 15	3,2	6,85	4,4	1,6	16
2	8,0	4,7	5,0	9,6	7,45	4,9	5,55	8,0	3,5	36
3	8,0	6,5	5,0	9,6	6,65	5,5	6,35	8,7	4,0	41
4	8,0	8,8	5,0	9,6	6,0	7,0	7,0	11,1	5,1	52

23. bis 24. Versuch.

Serum von tetanischen Säuglingen gegen Salzlösungen mit variiertem Ca-Gehalt.

23 1	8,0	6,5	5,0	5,9	6,6	5,0	6,3	8,1	3,9	66
23 2	8,0	4,7	5,0	5,9	6,4	4,2	6,55	6,6	3,1	52
24	8,0	—	5,0	5,6	7,6	1,3	5,1	4,1	2,8	50

Versuche von *Rona-Takahashi* (diese Zeitschr. **49**, 1913).

	Undialysabler Kalk auf Grund der Daten *nach* der Dialyse Proz. des Gesamtkalkes	Kalkgehalt der Dialysierflüssigkeit vor der Dialyse Ca O mg-Proz.
	1. Pferdeserum.	
a	42	13,3
b	37	9,1
c	32	4,5
	4. Schweineserum.	
a	41	15,7
b	33	8,2
c	11	3,6
	6. Rinderserum.	
a	30	16,6
b	18	8,2
c	16	4,0

Auch die hier aus Raumersparnis nicht gebrachten Versuche der erwähnten Autoren ergeben nach Umrechnung das gleiche Resultat.

Über Kalkbindung durch tierische Gewebe. XII.

Von

Ottilie Budde.

(Aus der Marburger Universitätskinderklinik.)

(Eingegangen am 4. Februar 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Gelegentlich ihrer Versuche über Kalkbindung durch tierische Gewebe konnten *Freudenberg* und *György*[1]) nachweisen, daß, wenn gleiche Mengen Eiweißlösung und Calciumchloridlösung gegeneinander dialysiert werden, stets auf der Seite des Eiweißes eine Ca-Anreicherung erfolgt. Weiter konnten sie zeigen, daß Knorpel, der mit $CaCl_2$-Lösung vorbehandelt war, imstande war, bei Verbringung in Phosphatlösung erhebliche Mengen Phosphat zu binden, während die umgekehrte Reihenfolge der Versuchsanordnung — Vorbehandlung mit Phosphat und Nachbehandlung mit $CaCl_2$ — nur zu ganz geringem P-Gehalt des Knorpels führte. Sie kommen an der Hand ihrer Untersuchungen zu folgender Vorstellung von dem Vorgang der Gewebsverkalkung: Es erfolgt zuerst eine Bindung von Ca an die Gewebskolloide. Diese Ca-Eiweißverbindung reagiert mit den Phosphaten und Carbonaten, und es entstehen Komplexverbindungen von Protein, Ca und Phosphat oder Carbonat, aus denen nachträglich $Ca_3(PO_4)_2$ und $Ca(HCO_3)_2$ abgespalten werden. Das Überwiegen der Phosphate über die Carbonate im Knochen wird erklärt durch die sauren Eigenschaften der Gewebseiweißkörper bei der herrschenden Reaktion, die aus dem Bicarbonat CO_2 frei machen.

Auf anderem Wege haben *Schwarz*, *Eden* und *Herrmann*[2]) versucht, das Problem der Verkalkung zu klären. Sie untersuchten nach Frakturen zu verschiedenen Zeiten den Callus und konnten feststellen, daß das anfangs mineralarme Bindegewebe sich nach Verlauf weniger Tage mit Ca anreichert, während sein Phosphatgehalt noch ein niedriger

---

[1]) Diese Zeitschr. **110**, 1920; **115**, 1921; **118**, 1921; **121**, 1921; **142**, 1923; **147**, 1924.

[2]) Ebendaselbst **149**, 1924; *Eden*, Klin. Wochenschr., Jahrg. 2, Nr. 39, 1923.

bleibt. Erst später erhöht sich auch dieser, und dann gewinnt der Callus knochenartige Härte. Bei Einlegen von Callus in Calcium- und Phosphatlösungen kommen sie zu denselben Ergebnissen wie *Freudenberg* und *György* beim Knorpel. Sie ziehen daraus den Schluß, „daß der primäre Prozeß der Verknöcherung in einer Anlagerung von Ca an organische Substanz besteht, der in sekundärer Reaktion die Bindung der Phosphorsäure folgt, bis beim Erreichen des Atomverhältnisses 1 Ca : 0,6 P der Callus zum Knochen wird“.

In der vorliegenden Arbeit sollte versucht werden, den Befund von *Schwarz*, *Eden* und *Herrmann*, daß bei Berührung mit calcium- und phosphathaltiger Flüssigkeit die Einlagerung von Ca in das Gewebe der von P zeitlich vorausgeht, im Modell zu reproduzieren und damit physikochemisch verständlich zu machen. Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob tatsächlich, wie *Freudenberg* und *György* annehmen, die Ca- und Phosphatanreicherung im eiweißhaltigen Medium durch die chemische Eigenschaft des Eiweißmoleküls bedingt ist, oder ob, wie dies *Liesegang*[1]) vertritt, nur der kolloidale Zustand des Mediums ihre Ursache ist.

Zu diesem Zwecke wurde Gelatine gegen die gleiche Menge einer Calcium-Phosphatlösung dialysiert, deren Gehalt an Ca und P etwa dem des Blutes im wachsenden menschlichen Organismus entsprach. Die Gelform der Gelatine — sie wurde in etwa 5proz. Lösung verwandt und während der ganzen Dauer des Versuchs im Eisschrank gehalten, so daß es nie zu einer Verflüssigung kam — gestattete es, auf die Zwischenschaltung einer Membran zu verzichten und so die physikalisch-chemischen Verhältnisse möglichst einfach zu gestalten. Es wurden mehrere Proben völlig gleich angesetzt, nach verschieden langer Zeit wurde die Dialyse unterbrochen und Flüssigkeit sowohl wie Gelatine auf ihren Gehalt an Ca und P untersucht. Dabei ergab sich, daß schon nach 6 Stunden die Gelatine mehr Ca enthielt als die Flüssigkeit. Im weiteren Verlauf des Versuchs stieg dann ihr Ca-Gehalt langsam noch weiter an, jedoch betrug die nach 48 Stunden erreichte höchste Ca-Konzentration nur 148 Proz. der nach 6 Stunden festgestellten. Dieser Wert entsprach etwa dem dreifachen des Ca-Gehalts der Flüssigkeit zu derselben Zeit. Es findet sich also auch in diesen Versuchen eine deutliche Anreicherung an Ca auf der Seite des eiweißhaltigen Mediums, die sich schon nach 6 Stunden bemerkbar macht.

Ganz anders verhielt sich das Phosphat. Nach 6 Stunden betrug der P-Gehalt der Gelatine etwa $\frac{1}{3}$ bis $\frac{1}{2}$ desjenigen der Flüssigkeit. Er stieg dann in regelmäßiger Folge weiter an und erreichte nach 48 Stunden im Maximum 210 Proz. des nach 6 Stunden festgestellten

[1]) Diese Zeitschr. **145**, 1924; **149**, 1924.

Wertes. Erst zu dieser Zeit ließ sich auch eine, wenn auch geringere P-Anreicherung der Gelatine gegenüber der Flüssigkeit nachweisen. Das klarste Bild der Verhältnisse in der *Gelatine* bietet der Quotient Ca/P, der im Verlauf des Versuchs von 5,0 auf 3,5, in einem anderen Falle von 5,8 auf 3,9 absank. Wiederholung der Versuche mit schwächer konzentrierter, etwa 2proz. Gelatine führte prinzipiell zu genau demselben Ergebnis, nur daß sich hier anfangs ein Anstieg des Quotienten zeigte, dem erst nach 48 Stunden ein deutlicher Abfall folgte. Das findet wohl seine Erklärung darin, daß bei dem geringeren Eiweißgehalt eine Ca-Bindung, für die ja an sich die Eisschranktemperatur denkbar ungünstige Bedingungen schafft, langsamer erfolgt, ist sie aber einmal eingetreten, so folgt ihr auch hier die Phosphatanreicherung nach, die ohne sie nicht möglich wäre. Eine Ausdehnung des Versuchs auf 72 Stunden brachte keine weitere Änderung.

Um den Beweis zu erbringen, daß die Verschiebung in dem Verhältnis Ca/P tatsächlich durch Eiweiß bedingt ist, wurde der gleiche Versuch mit Agar-Agar angesetzt. Dieses aus Algen hergestellte Präparat enthält nur 0,19 Proz. N, ist also im Vergleich zur Gelatine, die einen N-Gehalt von 17,0 Proz. hat, als praktisch stickstofffrei anzusehen. Die Versuche mit Agar ergaben einen prinzipiellen Unterschied gegen die mit Gelatine: das Verhältnis Ca/P blieb bis auf kleine, unregelmäßige Schwankungen, die im Bereich der Fehlergrenzen liegen, konstant; die Zunahme der Gallerte an Ca und P verläuft also gleichmäßig. Der Gehalt der Außenflüssigkeit an beiden Stoffen betrug zwar auch hier nach 48 Stunden etwas weniger als die Hälfte des Ausgangswertes, doch wurde nie eine so erhebliche Herabsetzung ihres Ca-Gehalts erreicht, wie in den Gelatineversuchen.

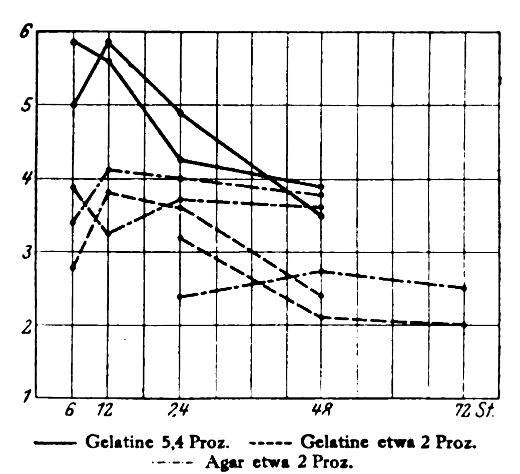


Abb. 1. Ca/P in Gelatine bzw. Agar p_H 6,4 bis 6,6.

Es ist somit der Beweis erbracht, daß ein eiweißhaltiges Medium aus einer es umspülenden Lösung von Calciumphosphat über das Maß gewöhnlicher Diffusion hinaus elektiv Calcium aufnimmt, und daß dieser Ca-Anreicherung erst später und in geringerem Grade die von Phosphat folgt. Dieses Verhalten ist an die Gegenwart von Stick-

stoff gebunden, stickstofffreie Gallerte zeigt es nicht. Damit gewinnt die Theorie von *Freudenberg* und *György*, daß der Eiweißgehalt des Gewebes bei seiner Verkalkung eine aktive Rolle spielt, und daß es sich nicht, wie *Liesegang* annimmt, um eine reine Fällungsreaktion in Gegenwart von Kolloiden handelt, eine neue Stütze. Die Feststellung von *Schwarz, Eden* und *Herrmann*, daß die Einlagerung von Calcium der von Phosphat zeitlich vorangeht, wird im Modellversuch bestätigt.

Der Versuch, auch das Verhalten von Gelatine gegenüber Calciumcarbonat bzw. -bicarbonatlösungen zu prüfen, scheiterte an der Unmöglichkeit, $Ca^{\cdot\cdot}$ neben HCO_3' in auch nur annähernd physiologischer Konzentration in Lösung zu halten. Eine Versuchsreihe, in der Pferdeserum gegen Gelatine dialysiert wurde, zeigte, daß schon in den ersten 6 Stunden ein gewisser Ca-Betrag — etwa $\frac{1}{4}$ des Gesamt-Ca-Gehalts des Serums — an die Gelatine abgegeben wurde, der sich im weiteren Verlauf des Versuchs nicht mehr wesentlich steigerte. Ebenso erfolgte in diesem ersten Versuchsabschnitt eine CO_2-Anreicherung der Gelatine von 4 auf 11 Vol.-Proz., die nachher kaum weiter anstieg, obgleich der CO_2-Gehalt des Serums fortlaufend abfiel, so daß nach 48 Stunden anstatt 43 nur noch 26 Vol.-Proz. CO_2 in Gelatine + Serum nachweisbar waren. Es scheinen also auch hier durch den Kontakt mit der Gelatine nicht unerhebliche Mengen von CO_2 zu Verlust zu gehen, ähnlich, wie *Freudenberg* und *György* das in ihren Versuchen nachweisen konnten. Es ist selbstverständlich, daß eine unmittelbare Übertragung dieser Versuche auf die Verhältnisse in vivo unstatthaft ist, weil hier eine praktisch konstante CO_2-Spannung im verkalkenden System herrscht.

Methodisches.

Es kamen folgende Substanzen bzw. Lösungen zur Verwendung:

1. *Gelatine.* Käufliche Gelatine in Blättern wurde im Eisschrank längere Zeit mit häufig gewechseltem destillierten Wasser unter Chloroformzusatz gewässert, einmal 24 Stunden in n/100 HCl gebracht und dann wieder gewässert, bis das Waschwasser keine Ca-Reaktion mehr gab. Wir erhielten so eine P-freie Gelatine von durchschnittlich 5 Proz. Trockensubstanz, einem p_H von 5,0 und einem Ca-Gehalt von etwa 40 mg-Proz. auf Trockensubstanz berechnet. Vor der Verwendung wurde die Gelatine durch Zusatz von einigen Kubikzentimetern n/10 NaOH auf p_H 6,5 gebracht und eventuell mit Wasser verdünnt. Sie ergab, auch bei einem Gehalt von nur 2 Proz., ein bei Eisschranktemperatur noch ausreichend steifes Gel. Im Verlauf des Versuchs waren makroskopisch keine Veränderungen, vor allen Dingen keine Trübungen, zu erkennen.

2. *Agar-Agar.* Agar-Agar in Fäden wurde in derselben Weise behandelt wie die Gelatine. Nur erwies es sich als nötig, ihn zur Entfernung des reichlich und augenscheinlich in sehr fester Bindung enthaltenden Ca mit n/10 HCl zu behandeln. Nach dem Auswässern war auch der Agar P-frei, enthielt 4,6 Proz. Trockensubstanz und etwas wechselnde Mengen Ca.

Er wurde nach Alkalisierung mit n/10 NaOH bis p_H 6,6 auf etwa 2 Proz. Trockensubstanzgehalt verdünnt. Die erhaltene Gallerte war weißlich trübe, in ihrer Konsistenz etwas steifer als die Gelatine, auch sie zeigte im Verlauf des Versuchs keine Veränderung.

3. *Calciumphosphatlösung.* Sie wurde gewonnen, indem 10 bis 15 g reines tertiäres Calciumphosphat mit 200 ccm n/200 HCl unter häufigem Durchschütteln 3 Tage bei Zimmertemperatur gehalten wurden. Danach wurde abfiltriert, das klare Filtrat durch Zusatz von 3 ccm n/10 NaOH auf p_H 6,4 bis 6,6 gebracht, am folgenden Tage von dem leichten, beim Alkalisieren entstandenen Niederschlag abfiltriert und der Ca- und P-Gehalt der Lösung bestimmt. Er schwankte in den einzelnen Ansätzen etwas, lag aber immer im Bereich der Konzentration dieser Elemente im Serum des wachsenden menschlichen Organismus. Außer den beiden zur Analyse gelangten Ionenarten enthielt die Lösung also nur noch Na und Cl, die auf das Versuchsergebnis ohne Einfluß sein dürften.

Die Ca-Analysen wurden nach der Methode von *de Waard*, die P-Analysen nach *Bell-Doisy* in der Modifikation des Verfahrens nach *Briggs*[1]) ausgeführt. Gelatine und Agar wurden zu diesem Zwecke in Quarztiegeln trocken verascht und die Asche in 2 ccm n HCl gelöst. Die Ca-Fällung in der Asche wurde in der Weise vorgenommen, wie sie *Hecht*[2]) zur Bestimmung des Ca-Gehalts im Gewebe angibt. Die Phosphatanalyse ließ sich ohne weiteres in der sauren Aschelösung ausführen, nachdem Versuche, in denen Phosphatlösungen sowohl direkt als auch nach Veraschung und Lösung in n HCl untersucht worden waren, zu völlig gleichen Resultaten geführt hatten. Die CO_2-Bestimmung geschah nach *Barcroft-Haldane*; bei einer Temperatur von 35° war das auch bei der Gelatine leicht durchführbar. Stets kam der Mittelwert zweier befriedigend übereinstimmenden Analysen zur Berechnung. p_H wurde kolorimetrisch nach *Michaelis* gemessen; da es uns nur auf ungefähre Feststellung der Reaktionslage ankam, schien dies auch in den verflüssigten Gallerten erlaubt. Zur Bestimmung der Trockensubstanz wurden gewogene Mengen bis zur Gewichtskonstanz bei 90° getrocknet.

Die Versuche verliefen nun folgendermaßen: Gelatine bzw. Agar wurden durch Erwärmen verflüssigt, in dünner Schicht in Standgläser ausgegossen und gewogen. Nach dem Erstarren wurde jeweils die gleiche Menge Calciumphosphatlösung aufgefüllt und die Proben im Eisschrank der Diffusion überlassen. Nach Ablauf der angegebenen Zeit wurde die Flüssigkeit abgegossen, die Gallerte zur Entfernung von Resten der Lösung dreimal mit eisgekühltem Wasser abgespült und dann, um eine völlig gleichmäßige Verteilung der eingelagerten Mineralbestandteile zu erreichen, durch Erwärmen verflüssigt. Während das bei der Gelatine durch verhältnismäßig geringe Temperaturen in kürzester Zeit erreicht war, bedurfte der Agar eines etwas längeren Aufenthalts im kochenden Wasserbad. Das brachte einen schwankenden, geringen Wasserverlust mit sich, so daß hier die nachher festgestellte Trockensubstanz nicht mehr ganz der am Ende des Versuchs entsprach, man also auf etwaige Quellung des Agars keine Schlüsse ziehen kann. Dieser Übelstand ließ sich jedoch nicht umgehen, wenn wir uns nicht der Gefahr aussetzen wollten, beim Abwägen der Proben für die einzelnen Analysen Stellen mit verschiedenem Mineralgehalt zu treffen.

[1]) Journ. of biol. Chem. **53**, 1922.

[2]) Diese Zeitschr. **143**, 1923.

Es werden deshalb bei den Versuchen mit Agar in den Tabellen nur die auf Trockensubstanz umgerechneten Werte angegeben, sowie der Quotient Ca/P, der ja durch einen Flüssigkeitsverlust nicht beeinflußt wird. Nach dem Erkalten kamen gewogene Proben der Gallerten zur Analyse.

In den Versuchsprotokollen fällt auf, daß meist nicht ganz der volle Ca-Gehalt der beiden Ausgangslösungen wieder zum Nachweis kommt. Wir glauben das so erklären zu können, daß besonders bei den länger ausgedehnten Versuchen eine Neigung zum Ausfallen von Ca in der Lösung besteht und so geringe Ca-Mengen bei direkter Fällung sich dem Nachweis entziehen. In der Gelatine wird durch das Veraschen und Lösen in Säure ja sicher das gesamte vorhandene Ca erfaßt, und auf sie kommt es für die Deutung unserer Versuche doch letzten Endes allein an.

Versuchsprotokolle.

Versuch 1.

Calciumphosphatlösung p_H 6,4, Gelatine p_H 6,5.

Zeit der Dialyse	Trockensubstanz Proz.	Ca mg-Proz.			P mg-Proz.			Ca/P in der Gelatine
		Lösung	Gelatine	auf Trockensubstanz	Lösung	Gelatine	auf Trockensubstanz	
Vorher	5,366	12,45	2,05	38,1	4,15	—	—	—
6 Stdn. .	4,947	6,0	6,78	137,1	3,2	1,168	23,61	5,836
12 „ .	4,835	4,36	7,69	159,1	2,9	1,362	28,17	5,626
24 „ .	4,798	3,46	7,96	165,8	2,65	1,837	38,29	4,33
48 „ .	4,694	2,4	7,83	166,9	2,7	1,987	42,34	3,943

Versuch 2.

Calciumphosphatlösung p_H 6,4, Gelatine p_H 6,5.

Zeit der Dialyse	Trockensubstanz Proz.	p_H der Lösung	Ca mg-Proz.			P mg-Proz.			Ca/P in der Gelatine
			Lösung	Gelatine	auf Trockensubstanz	Lösung	Gelatine	auf Trockensubstanz	
Vorher	5,366	6,4	12,45	2,05	38,1	4,15	—	—	—
6 Stdn. .	4,927	6,5	6,18	6,72	136,5	2,95	1,341	27,28	5,004
12 „ .	4,874	6,4	4,72	8,35	171,4	2,84	1,434	29,46	5,818
24 „ .	4,520	6,4	2,90	8,48	187,6	2,65	1,956	43,68	4,935
48 „ .	4,384	6,3	2,63	8,85	201,9	2,0	2,513	57,33	3,522

Versuch 3.

Calciumphosphatlösung p_H 6,5, Gelatine p_H 6,6.

Vorher	1,994	6,5	9	0,339	17,1	4	—	—	—
6 Stdn. .	1,877	6,6	6	2,43	129,7	3,25	0,902	48,09	2,697
12 „ .	1,824	6,6	5	3,78	208,6	3,1	0,982	54,11	3,837
24 „ .	1,823	6,6	4,2	4,33	237,6	2,65	1,186	65,07	3,652
48 „ .	1,753	6,5	3,4	4,24	240,9	2,5	1,606	91,59	2,409

Versuch 4.

Calciumphosphatlösung p_H 6,4, Gelatine p_H 6,5.

Zeit der Dialyse	Trockensubstanz Proz.	p_H der Lösung	Ca mg-Proz.			P mg-Proz.			Ca/P in der Gelatine
			Lösung	Gelatine	auf Trockensubstanz	Lösung	Gelatine	auf Trockensubstanz	
Vorher	2,129	6,4	8,8	1,28	60,55	4,4	—	—	—
24 Stdn. .	1,786	6,3	4,0	4,43	248,1	2,625	1,348	75,43	3,289
48 „ .	1,678	6,3	3,2	3,97	236,7	2,06	1,813	108,0	2,192
72 „ .	1,69	6,3	2,8	3,88	229,6	2,1	1,89	111,9	2,052

Versuch 5.

Calciumphosphatlösung p_H 6,65, Agar-Agar p_H 6,7.

Zeit der Dialyse	Trockensubstanz Proz.	p_H der Lösung	Ca mg-Proz.		P mg-Proz.		Ca/P im Agar
			Lösung	Agar auf Trockensubstanz	Lösung	Agar auf Trockensubstanz	
Vorher .	1,552	6,65	11,64	208	7,75	—	—
6 Stdn.	2,10	6,65	7,6	351,2	4,15	101,6	3,458
12 „ .	2,041	6,7	6,4	413,5	3,55	99,5	4,158
24 „ .	1,86	6,65	5,6	443,4	3,25	108,6	4,085
48 „ .	1,935	6,7	5,0	509,9	2,55	132,7	3,834

Versuch 6.

Calciumphosphatlösung p_H 6,5, Agar-Agar 6,6.

Vorher .	1,975	6,5	9	95,9	5,5	—	—
6 Stdn.	2,319 •	6,7	4,8	202,8	2,8	51,2	3,963
12 „ .	1,908	6,7	4,2	371	2,75	111,3	3,333
24 „ .	1,889	6,7	4,0	411,8	2,5	108,6	3,791
48 „ .	2,085	6,6	3,7	375,1	2,15	104	3,606

Versuch 7.

Calciumphosphatlösung p_H 6,3, Agar-Agar p_H 6,6.

Vorher .	1,419	6,3	8	79,3	4,1	—	—
24 Stdn.	1,64	6,4	3,2	242,5	2,33	98,9	2,45
48 „ .	1,581	6,45	4,0	244,7	2,6	89,5	2,734
72 „ .	1,59	6,4	3,4	262,1	2,4	106,0	2,473

Versuch 8.

Altes, abgelagertes Pferdeserum, Gelatine p_H 7,4.

Zeit der Dialyse	Trockensubstanz Proz.	Ca mg-Proz.		CO_2 Vol.-Proz.	
		Serum	Gelatine	Serum	Gelatine
Vorher . .	5,26	11,8	1,14	39,4	4,0
6 Stdn. . .	5,57	8,0	2,76	27,4	11,0
12 „ . .	5,56	8,0	2,6	18,5	12,4
24 „ . .	5,67	7,6	2,6	17,5	11,4
48 „ . .	5,59	7,0	2,4	10,6	15,4

Zusammenfassung.

1. Aus Calciumphosphatlösungen über Gelatinegel nimmt dieses in den ersten Stunden viel Ca und wenig P auf, später wird weniger Ca und mehr P als vorher aufgenommen. Hierdurch sinkt der Quotient Ca/P in der Gelatine ab.

2. In praktisch eiweißfreiem Agargel erfolgt unter analogen Verhältnissen eine gleichmäßige Aufnahme von Ca und P, Ca/P schwankt nur ganz unbedeutend.

3. Da der Unterschied der beiden Fälle im Eiweißgehalt liegt, wird gefolgert, daß entsprechend der Verkalkungstheorie von *Freudenberg* und *György* zuerst Ca an Eiweiß, dann Phosphat komplex gebunden wird.

4. Die Befunde von *Schwarz*, *Eden* und *Hermann* an Frakturcallus, die in vivo ein ganz analoges Ergebnis hatten, stellen einen weiteren Beweis für die Richtigkeit dieser Theorie dar.

Zur Kenntnis des „Oxyproteinsäure" genannten Harnbestandteils.

Von

Ernst Freund und **Anna Sittenberger-Kraft.**

(Aus dem chemischen Laboratorium der Krankenanstalt „Rudolf-Stiftung" Wien.)

(Eingegangen am 5. Februar 1925.)

In einer „Über die Stickstoffverteilung in der Oxyproteinsäurefraktion des Harnes" betitelten Arbeit gibt *Ludwig Brings*[1]) zwar zu, „ein anderer Teil des Stickstoffs (der Oxyproteinsäure) befindet sich allerdings in einer derartigen Bindung, daß er durch Barythydrolyse oder aber durch Säurehydrolyse gelockert und als Ammoniak abgespalten werden kann", kommt aber zu dem Schlußsatze: „Es hat sich die Irrigkeit der Behauptung ergeben, derzufolge die Oxyproteinsäuren nicht den Eiweißkörpern, vielmehr dem Harnstoff nahestehen sollen."

Als Autoren der beanstandeten Behauptung[2]) müssen wir gegen die Berechtigung dieser Beanstandung Einspruch erheben; es handelt sich dabei nicht um einen Widerspruch in den Resultaten von Analysen, sondern nur um ein Übersehen eines der wichtigsten Punkte unserer Arbeit seitens Herrn *Brings.*

Dieser wichtigste Punkt unserer Arbeit betraf den Umstand, daß, von der Arbeit *Gottliebs* und *Bondzynski* angefangen, alle Bestimmungen der Oxyproteinsäure den kardinalen Fehler begangen haben, die Kolloide des Harns nicht zu entfernen, sondern dem Baryt- bzw. dem Quecksilberacetatniederschlag beigemengt zu belassen.

Erst wir haben bei der Darstellung vor allem durch Fällung mit Kupfersulfat und Natronlauge die kolloiden N-haltigen Bestandteile entfernt und dann erst den Quecksilberacetat- bzw. den Barytniederschlag abgeschieden.

Wir haben in den Schlußsätzen darauf hingewiesen: „Es läßt dies auch begreiflich erscheinen, daß bei den Modifikationen der Methodik so verschiedene Formen der Oxyproteinsäure gefunden worden sind, die sich vor allem durch verschiedenen S-Gehalt unterscheiden.

Bei der nunmehrigen Methodik ist aber die Ausfällung der Kolloide vollkommen durchgeführt, und die Substanz, die resultiert, zeigt noch immer die charakteristischen Eigenschaften der Oxyproteinsäuren gegen-

---

[1]) Diese Zeitschr. **154**, 35, 1924.

[2]) Ebendaselbst **136**, 195, 1923.

über Baryt und Quecksilbersalzen, ist daher als der wichtigste Bestandteil der als „Oxyproteinsäure" ursprünglich bezeichneten Substanzen anzusehen."

Die von *Brings* zu seinen Gunsten zitierte Arbeit von *S. Edelbacher*[1]) sagt in den Schlußsätzen: „Daraus folgt von selbst, daß eine quantitative Bestimmung von ‚Proteinsäuren', wie sie von einer Reihe von Autoren beschrieben wird, nur *ein Konvolut verschiedenartigster Substanzen* bestimmt."

Edelbacher stimmt also unserer Ansicht zu.

Auch in einer Arbeit von *H. Liebermann*[2]) aus dem Leipziger chemischen Institut findet sich unter den Schlußsätzen: „Die ‚Alloxyproteinsäure', die Ätherschwefelsäure enthält, ist keine einheitliche Substanz."

Es wird nach diesen Zitaten nicht wundernehmen, daß bei der usuellen Darstellung Herr *Brings* auch Aminosäuren unter den Zerfallsprodukten der Oxyproteinsäuren findet.

Es liegt demnach kein Anlaß vor, unsere Beobachtung als Irrigkeit zu erklären, sondern vielmehr die Notwendigkeit, entsprechend unserem Vorgehen bei der Oxyproteinsäuredarstellung, wenigstens die Kolloide zu entfernen.

---

[1]) *S. Edelbacher*, Zeitschr. f. physiol. Chem. 127, 186.

[2]) *H. Liebermann*, ebendaselbst 52, 129.

Experimentelle Beiträge zur Frage der hypertonischen Hyperglykämie.

Von

G. Fritz und B. Paul.

(Aus dem pharmakologischen Institut der k. ung. Pázmány-Péter-Universität Budapest.)

(Eingegangen am 7. Februar 1925.)

Seit dem *Neubauer*schen Befunde aus dem Jahre 1910 (1), wonach in einer großen Anzahl von Fällen sogenannter Hochdrucknephritis der Blutzuckerspiegel erhöht ist, und der *Neubauer*schen Annahme, daß diese Erhöhung von einer verringerten Zuckerdurchlässigkeit der erkrankten Nieren herrührt, hat sich eine ganze Anzahl von Autoren mit der Klärung obigen Problems von der klinischen Seite her beschäftigt, indem sie das Blutserum von Nephritikern untersucht haben.

Der *Neubauer*schen Annahme widersprechen ernstlich *Roses* (2) Angaben, der an Tieren, denen beide Nieren exstirpiert wurden, keinerlei Veränderung im Blutzucker konstatieren konnte; desgleichen auch *Fleckseders* (3) Versuchsergebnisse, der in Fällen experimentell erzeugter Uran-, Chrom- und Sublimatnephritis zwar eine Hyperglykämie auftreten sah, die aber auch nach erfolgter Nierenexstirpation weiter bestehen blieb.

Es läßt sich also die eine Nephritis begleitende Hyperglykämie ***nicht*** durch die Nierenläsion erklären, und ist auch eine weitere Annahme von *Neubauer*, wonach die Erkrankung der Nieren sich auf die Nebennieren ausbreiten und auf diese Weise erst die Hyperglykämie ausgelöst würde, von der Hand zu weisen.

Dieser zweiten Annahme *Neubauers* haben sich *Tanhauser* und *Pfitzner* (4), *N. Hirsch* (5), *Hitzenberg* und *Richter-Quittner* (6), *Hetényi* (7) usw. angeschlossen, die die Hyperglykämie einer infolge der Hypertonie einsetzenden Hyperadrenalinämie zuschreiben; desgleichen auch *Schur* und *Wiesel* (8), die mit dem Blutserum von Kranken mit chronischer Nephritis am isolierten Froschauge eine stärkere *Ehrmann*sche Reaktion erhielten, als mit Normalserum, und dies gesteigertem Adrenalingehalt des Nephritikerserums zuschreiben.

Die Richtigkeit obiger Annahme, die längere Zeit hindurch befürwortet wurde, fand ihre Widerlegung durch *Hülses* (9) überzeugende Versuche, der venöses und arterielles Blut von Hypertonikern an *Loewen-Trendelenburg*schen Froschpräparaten prüfte, ohne aber einen Anhalts-

punkt dafür zu finden, daß in diesem Blute mehr vasokonstriktorisch wirksame Stoffe vorhanden wären, als im Blute von Gesunden. Es konnte sich also etwa in *Schur* und *Wiesels* Versuchen darum handeln, daß im Blute des Nephritikers während dessen Gerinnung mehr den Sympathicus reizende Stoffe entstehen und in das Serum gelangen, als im normalen Blute; nun kann auch die Auffassung, wonach die Hyperglykämie die Folge einer Hyperadrenalinämie wäre, nicht zu Recht bestehen.

Hülse (10) fand in Fortsetzung seiner Versuche, daß durch das Serum von Hypertonikern (mit Ausnahme der Fälle von essentieller Hypertonie) die Adrenalinempfindlichkeit erhöht wird. Brachte er nämlich seinen Versuchstieren vor der Adrenalininjektion normales Serum bei, so fiel die Adrenalinwirkung normal aus; verwendete er hingegen Serum von Nephritikern mit Hypertonie, so war die Adrenalinwirkung eine bedeutend stärkere. Auf diesen Befunden fußt die Auffassung von *Hülse* und *Kraus* (11), wonach im Blute von Nephritikern mit Hypertonie zwar nicht mehr Adrenalin kreist als im Blute von Gesunden, ersteres jedoch großmolekulare Eiweißspaltprodukte enthält, durch die das Gefäßsystem gegen Adrenalin sensibilisiert wird. Durch diese Sensibilisierung wird es bewirkt, daß das Gefäßsystem des Nephritikers durch normale Mengen von Adrenalin stärker gereizt wird, als das der Gesunden, daher es zu einer Hypertonie kommen muß. Auf dieser Grundlage sieht *Hetényi* (12) nicht nur die Frage der Hypertonie, sondern auch die an Hypertonikern beobachtete Hyperglykämie geklärt.

In vorliegender Arbeit haben wir es uns zur Aufgabe gemacht, den Zusammenhang zwischen Hypertonie und Hyperglykämie zu klären; jedoch nicht an Nephritikern mit Hypertonie, sondern in experimentell erzeugten Fällen von „mechanisch-physikalischer oder pharmakologischer“ Hypertonie. Unsere Versuche wurden abwechselnd an Kaninchen und an Katzen ausgeführt, um eventuelle Verschiedenheiten im Verhalten verschiedener Tierarten nachweisen zu können. Die Versuchstiere wurden einmal mit Urethan, ein anderes Mal mit Billrothmischung (Chloroform, Alkohol, Äther) narkotisiert, um die an verschiedenartig narkotisierten Tieren erhaltenen Resultate vergleichen zu können; doch sei hier gleich erwähnt, daß sich in unseren Ergebnissen diesbezüglich keine Unterschiede ergaben. Der Blutdruck wurde nach der allgemein üblichen Methodik mittels einer in die Carotis eingebundenen Kanüle auf einem Kymographion registriert. Die intravenösen Injektionen erfolgten durch eine in die Vena jugularis eingebundene Kanüle. Die zur Bestimmung des Blutzuckers nötigen Blutproben wurden entweder der Carotis der anderen Seite, oder aber einer Arteria femoralis entnommen; unsere nachfolgend angeführten Daten beziehen sich also stets auf arterielles Blut. Die Blutproben wurden mit der *Bang*schen Methode mittels der *Ernst* und *Weiss*schen (13) Pipetten abgemessen und stets drei Parallelbestimmungen ausgeführt; ihre Ergebnisse wurden nur in dem Falle zu einem Mittelwert vereinigt verwendet, wenn sie nicht mehr als um 0,01 Proz. voneinander verschieden waren.

Versuche mit Strychnin.

Um zu verhüten, daß eine Hyperglykämie, die wir von der experimentell erzeugten Hypertonie erwartet haben, etwa bereits infolge der durch das Strychnin bewirkten Muskelkrämpfe erzeugt werde, haben wir den Tieren, ehe sie das Strychnin erhielten, pro 1 kg Körpergewicht je 2 ccm Curaril (*Byk*) intravenös eingespritzt und konnten auf diese Weise erreichen, daß die Wirkung des Strychnins ausschließlich in einer Erhöhung des Blutdrucks bestand. Dieser Erhöhung ging allerdings eine Herabsetzung des Blutdrucks infolge der Curareinjektion voran; daher wir mit den eigentlichen Versuchen erst beginnen konnten, nachdem jene anfängliche Blutdrucksenkung vorübergegangen war.

In den Fällen, in denen sich infolge der Curarelähmung die Notwendigkeit der künstlichen Atmung ergab, haben wir diese durch eine in die Trachea eingebundene Kanüle mittels der *H. H. Meyer*schen Pumpe besorgt, dabei aber Sorge getragen, daß Atemfrequenz und -volumen genau der Norm entsprechen. Trotzdem haben wir mit Rücksicht auf den seit den Untersuchungen von *Duzar* und *Fritz* (14) bekannten Einfluß der Hyperventilationen bzw. Hypoventilationen auf den intermediären Stoffwechsel und auf die Empfindlichkeit der Vasokonstriktoren in einzelnen Fällen auch die Wasserstoffionenkonzentration im Blute nach der *Holló-Weiss*schen (15) Methode festgestellt; konnten aber weder am spontan atmenden, noch am künstlich ventilierten Tiere irgendwelche Veränderung im p_H nachweisen.

Versuch 1. Kaninchen, Gewicht 1700 g. Urethannarkose; Curare intravenös; Blutzucker 0,135 Proz., wahrscheinlich infolge der Curareeinspritzung erhöht (*Bang*) (16). Nach der intravenösen Einspritzung von 1 mg Strychnin steigt der Blutdruck mächtig an, fällt dann langsam ab, um nunmehr auf einem ständigen Niveau zu verharren; nach 5 Minuten beträgt der Blutzuckergehalt 0,18 Proz., ist also um 33 Proz. gesteigert (Tabelle I).

Nachdem wir uns auf diese Weise vergewissert haben, daß die durch Strychnin bewirkte Blutdrucksteigerung eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels zur Folge hat, haben wir, um eine Hyperadrenalinämie als Ursache der Hyperglykämie auszuschließen, in zwei nachfolgenden Versuchen beide Nebennieren abgebunden und entfernt; dabei aber Sorge getragen, daß von dem sehr zerreißlichen Nebennierengewebe nichts zurückbleibe. Nach einigen anfänglichen Mißerfolgen und nach entsprechender Verbesserung unserer Operationstechnik war uns später die restlose Entfernung der Nebennieren stets gelungen. Auch sorgten wir dafür, daß die Operation ohne Blutverlust vor sich gehe. Da es von *Trendelenburgs* (17) Versuchen her bekannt ist, daß nicht nur die Laparotomie, sondern auch die Reizung der Haut allein schon von einer gesteigerten Adrenalinproduktion gefolgt sein kann, haben wir unsere Versuche stets erst 30 Minuten nach Schließung der Bauchhöhle ausgeführt und konnten wohl mit Recht annehmen, daß während dieser Zeit das vor der Nebennierenexstirpation geschilderte und im Blute kreisende Adrenalin gänzlich zersetzt ward. Angesichts des bedeutenden Abfalls des Blutdrucks, der infolge der doppelseitigen

Nebennierenexstirpation eintritt, sind wir bei der Bewertung der vom Strychnin erwarteten Blutdrucksteigerung vom Blutdruck ausgegangen, der *vor* der Nebennierenexstirpation bestanden hatte, nicht aber von dem verringerten Blutdruck, der im Anschluß an die Operation zu konstatieren war.

Versuch 2. Kaninchen, Gewicht 2100 g. Urethannarkose; Laparotomie; Nebennierenexstirpation; Curare intravenös; Blutzucker 0,132 Proz.; 1 mg Strychnin intravenös; bedeutende Blutdrucksteigerung; Blutzucker beträgt nach 5 Minuten 0,19 Proz., ist also um 43 Proz. angestiegen (Tabelle I).

Versuch 3. Katze, Gewicht 3450 g. Narkose mit Billrothgemisch; Laparotomie, Nebennierenexstirpation; Curare intravenös; künstliche Atmung; Blutzucker 0,114 Proz.; 2 mg Strychnin intravenös; starke Blutdrucksteigerung; Blutzucker nach 5 Minuten 0,157 Proz., also um 36 Proz. angestiegen. Nach ½stündiger Ruhepause wurde der Versuch wiederholt; Blutzucker zunächst 0,104 Proz.; 1 mg Strychnin; starke Blutdrucksteigerung; Blutzucker nach 5 Minuten 0,14 Proz., also um 34 Proz. angestiegen (Tabelle I).

Tabelle I.

Strychninversuche.

Nr.	Tierart	Nebennieren	Normaler Blutdruck mm Hg	Normaler Blutzucker Proz.	Nach Strychnin Blutdruck mm Hg	Nach Strychnin Blutzucker Proz.	Blutzucker erhöht um Proz.	Narkose	Bemerkungen
1	Kaninchen	belassen	96	0,135	174	0,18	33	Urethan	
2	„	exstirpiert	101	0,132	187	0,19	43	„	
3	Katze	„	107	0,114	195	0,157	36	Billrothgemisch	
			107	0,104	179	0,14	34		Dasselbe Tier ½ Stunde später

Aus obigen Daten geht klar hervor, daß die durch Strychnin bewirkte Blutdrucksteigerung sowohl an gesunden Tieren, wie auch an solchen, denen die Nebennieren entfernt wurden, stets zu einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels führt; daher die mit der Hypertonie einhergehende Hyperglykämie nicht direkt durch eine Hyperadrenalinämie verursacht sein kann.

In den nun zu beschreibenden Versuchen haben wir einige andere blutdrucksteigernde Mittel verwendet.

Versuche mit Bariumchlorid.

Versuch 4. Kaninchen, Gewicht 1850 g. Urethannarkose; normaler Blutzucker 0,09 Proz.; 5 g $BaCl_2$ in 5 ccm physiologischer NaCl-Lösung intravenös eingespritzt, worauf der Blutdruck sehr stark ansteigt und der Blutzuckergehalt nach 5 Minuten 0,16 Proz. beträgt, also um 77 Proz. angestiegen ist (Tabelle II).

Versuch 5. Kaninchen. Urethannarkose; Laparotomie; Exstirpation beider Nebennieren; Blutzuckergehalt anfangs 0,117 Proz.; 5 g $BaCl_2$ in 5 ccm physiologischer NaCl-Lösung intravenös eingespritzt, worauf eine starke Steigerung des Blutdrucks erfolgt und nach 5 Minuten der Blutzuckergehalt auf 0,141 Proz., also um 20 Proz. angestiegen ist (Tabelle II).

Versuch 6. Katze, Gewicht 3100 g. Narkose mit Billrothgemisch; Exstirpation der Nebennieren; Blutzuckergehalt 0,12 Proz.; 7 g $BaCl_2$ in 5 ccm physiologischer NaCl-Lösung intravenös eingespritzt; starke Steigerung des Blutdrucks; Blutzuckergehalt 5 Minuten später 0,19 Proz., also um 41 Proz. erhöht.

Tabelle II.

Versuche mit Bariumchlorid.

Nr.	Tierart	Nebennieren	Normaler		Nach $BaCl_2$		Blutzucker erhöht um	Narkose
			Blutdruck mm Hg	Blutzucker Proz.	Blutdruck mm Hg	Blutzucker Proz.	Proz.	
4	Kaninchen	erhalten	97	0,09	186	0,16	77	Urethan
5	„	exstirpiert	95	0,117	162	0,14	20	„
6	Katze	„	104	0,12	193	0,17	41	Billrothgemisch

Aus den Daten der Tabelle II ist klar zu ersehen, daß die durch $BaCl_2$ erzeugte Blutdrucksteigerung genau so wie die durch Strychnin erzeugte mit einer Hyperglykämie einhergeht, und zwar auch an jenen Tieren, deren Nebennieren entfernt wurden; also eine Hyperadrenalinämie als auslösendes Moment für die Hyperglykämie nicht in Betracht kommt. Daher kann auch die durch *Hülse* angenommene Überempfindlichkeit der durch gewisse Eiweißspaltprodukte dem Adrenalin gegenüber sensibilisierten Vasokonstriktoren ebenfalls nicht zu Recht bestehen. Die Möglichkeit, daß durch sonstige Gewebe chromaffinen Charakters Adrenalin auch nach erfolgter Nebennierenexstirpation ausgeschüttet wird, ist allerdings nicht von vornherein von der Hand zu weisen; konnte aber von *Trendelenburg* (18) nicht bestätigt werden. Auch ist *Trendelenburg* der Meinung, daß die Menge des auf diese Weise allenfalls erzeugten Adrenalins eine so geringe ist, daß sie praktisch nicht in Betracht kommt. Die Annahme aber, daß in unseren Versuchen noch das Adrenalin im Blute zirkuliert hätte, das durch die Nebennieren vor ihrer Exstirpation erzeugt wurde, ist um so weniger berechtigt, da ja eine bestimmte Menge Adrenalin, das in die Blutbahn gelangt, daselbst, wie bekannt, binnen 1 Stunde oxydiert wird, an unseren Tieren aber, von der Exstirpation der Nebennieren an bis zum Beginn der Versuche gerechnet, tatsächlich gegen 1 Stunde vergangen ist.

Versuche mit Strophantin.

Versuch 7. Katze, Gewicht 3600 g. Narkose mit Billrothmischung; Nebennierenexstirpation; Blutzucker 0,13 Proz.; nach intravenöser Injektion von 0,5 mg Strophantin starke Blutdrucksteigerung, auf deren Höhe der Blutzuckergehalt 0,16 Proz. beträgt, also um 23 Proz. angestiegen ist; 8 Minuten nach der Injektion plötzlicher Abfall des Blutdrucks, Exitus (Tabelle III).

Versuch 8. Katze, Gewicht 3300 g. Urethannarkose; Blutzucker 0,127 Proz.; 0,5 mg Strophantin in 10 ccm physiologischer NaCl-Lösung intravenös injiziert; Blutdrucksteigerung; Blutzucker nach 5 Minuten 0,144 Proz., also um 13 Proz. angestiegen (Tabelle III).

Tabelle III.

Strophantinversuche.

Nr.	Tierart	Nebennieren	Normaler Blutdruck mm Hg	Normaler Blutzucker Proz.	Nach Strophantin Blutdruck mm Hg	Nach Strophantin Blutzucker Proz.	Blutzucker erhöht um Proz.	Narkose
6	Katze	exstirpiert	108	0,13	162	0,161	23	Billrothmischung
7	„	„	100	0,127	173	0,144	13	Urethan

Wie aus den Daten der Tabelle III ersichtlich, geht auch die durch Strophantin bewirkte Blutdrucksteigerung mit einer Hyperglykämie einher, obzwar der Mechanismus der Blutdrucksteigerung hier ein ganz anderer ist, als beim Strychnin oder beim $BaCl_2$: in beiden letzteren Fällen handelt es sich um eine Gefäßverengerung; beim Strophantin aber um eine Erhöhung des Schlagvolumens (*Pick*) (19). Aus den Ergebnissen der vorangehend beschriebenen Versuche 1 bis 7 läßt sich also mit Recht schließen, daß jede durch Pharmaka hervorgerufene Hypertonie von einer Hyperglykämie gefolgt wird, auf welchem Mechanismus immer jene Hypertonie beruhe.

Versuche mit Kompression der Aorta.

Zur Ergänzung unserer oben erörterten Befunde schien es uns von Interesse, nachzuweisen, ob die Blutdrucksteigerung infolge der Kompression der Aorta, die nach *Neubauer* von einer Albuminurie und Glucosurie begleitet wird, wohl ebenfalls zu einer Hyperglykämie führt?

Versuch 9a. Kaninchen. Urethannarkose; Laparotomie; Nebennierenexstirpation; Blutzucker 0,142 Proz.; die Aorta wird einige Minuten hindurch unmittelbar unter dem Zwerchfell mit den Fingern komprimiert, die durch die auf eine kleine Strecke geöffnete Bauchwand in die Bauchhöhle eingeführt wurden; der Blutdruck steigt bedeutend an; der Blutzucker beträgt 0,164 Proz., ist also um 15 Proz. angestiegen (Tabelle IV).

Versuch 9b. Nach einer Ruhepause von 30 Minuten wird dasselbe Tier curaresiert; der Blutzuckergehalt beträgt jetzt 0,135 Proz.; nach intravenöser Injektion von 1 mg Strychnin stellt sich eine starke Steigerung des Blutdrucks ein und der Blutzuckergehalt beträgt nach 5 Minuten 0,174 Proz., ist also um 27 Proz. angestiegen (Tabelle IV).

Tabelle IV.

Versuche mit Kompression der Aorta.

Nr.	Tierart	Nebennieren	Normaler Blutdruck mm Hg	Normaler Blutzucker Proz.	Nach Kompression d. Aorta Blutdruck mm Hg	Nach Kompression d. Aorta Blutzucker Proz.	Blutzucker erhöht um Proz.	Narkose
9a	Kaninchen	exstirpiert	96	0,142	152	0,164	15	Urethan
9b			82	0,137	171	0,174	27	
10a	Katze	„	102	0,128	166	0,133	4	Billrothmischung und Urethan
10b			96	0,117	197	0,159	35	

Versuch 10a. Katze. Narkose mit Billrothmischung begonnen und mit Urethan fortgesetzt; Laparotomie; Nebennierenexstirpation; Blutzucker 0,128 Proz.; infolge der Kompression der Aorta Steigerung des Blutdrucks; Blutzuckergehalt 0,133 Proz., also um 4 Proz. angestiegen (Tabelle IV).

Versuch 10b. Nach einer Ruhepause von 30 Minuten wird dasselbe Tier curaresiert und die künstliche Atmung eingeleitet; Blutzucker 0,117 Proz.; nach intravenöser Injektion von 2 mg Strychnin tritt eine große Steigerung des Blutdrucks ein und der Blutzucker beträgt nach 5 Minuten 0,159 Proz., ist also um 35 Proz. angestiegen (Tabelle IV).

Aus Versuchen 9 und 10 ist einerseits zu ersehen, daß auch die durch Kompression der Aorta bewirkte Steigerung des Blutdrucks und einer Erhöhung des Blutzuckerspiegels einhergeht, andererseits aber, daß diese Erhöhung bloß etwa 4 bis 15 Proz. beträgt, also weit geringer ist, als bei Anwendung verschiedener Pharmaka, mit denen wir eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels um 27 bis 77 Proz. erhalten haben. Besonders klar geht dieser Unterschied in dem Grade der Hyperglykämie (bei nicht wesentlich verschiedener Blutdrucksteigerung) aus unseren Versuchen 9 und 10 hervor, in denen wir die Steigerung des Blutdrucks an demselben Tiere erst durch Kompression der Aorta, hinterher aber durch Injektion von Strychnin bewirkt hatten.

Die weit geringere Hyperglykämie nach Kompression der Aorta läßt sich etwa wie folgt begründen: Der Blutdruck wird infolge der Kompression der Aorta bloß in den oberhalb des Zwerchfells gelegenen Körperteilen gesteigert; in den darunter gelegenen wird er im Gegenteil herabgesetzt, was zu einer schlechten Blutversorgung der Leber mit ihren großen Kohlehydratvorräten, also gleichsam zu ihrer Ausschaltung aus dem Blutkreislauf führen muß. Da es auf diese Weise in der Leber zu keiner Hypertonie, daher auch zu keiner erhöhten Zuckerabgabe kommt, zudem auch das Leberblut bloß in geringen Mengen und nur unter Hindernissen in das hypertonisierte, oberhalb des Zwerchfells gelegene Gebiet zu gelangen vermag, ist es klar, daß dieses den Zucker bloß von seiten der Muskulatur erhalten konnte. Diese unsere Annahme wird durch die Tatsache gestützt, daß, sobald die Leber nach Aufhören der Kompression der Aorta wieder in den Blutkreislauf eingeschaltet war, der Blutzucker höhere Werte aufweist.

Aus unseren voranstehend beschriebenen Versuchen lassen sich folgende Schlüsse ziehen:

1. *Jede Hypertonie, sei sie durch Pharmaka* (auf dem Wege der Vasokonstriktion oder durch Vergrößerung des Schlagvolumens) *oder aber auf mechanischem Wege* (durch Kompression der Aorta) *entstanden, führt zu einer Hyperglykämie.*

2. *Diese Hyperglykämie ist nicht einer durch die Hypertonie bewirkten Hyperadrenalinämie zuzuschreiben.*

3. *Die Hyperglykämie rührt auch nicht von einer erhöhten Adrenalinempfindlichkeit der sensibilisierten Vasokonstriktoren her, da eine Erhöhung des Blutzuckerspiegels auch nach Exstirpation der Nebennieren*

und auch wenn die Hypertonie durch Kompression der Aorta zustande kommt eintritt.

4. *Die Hyperglykämie wird durch die Hypertonie an sich, als durch ein physikalisches Moment, verursacht.*

Literatur.

1) *Neubauer*, diese Zeitschr. **25**. — 2) *Rose*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **50**. — 3) *Fleckseder*, ebendaselbst **56**. — 4) *Tanhauser* und *Pfitzner*, Münch. med. Wochenschr. 1913. — 5) *Hirsch*, diese Zeitschr. **75**. — 6) *Hitzenberg* und *Richter-Quittner*, Wien. Arch. **8**. — 7) *Hetényi*, Med. Klin. 1923. — 8) *Schur* und *Wiesel*, Wien. klin. Wochenschr. 1907. — 9) *Hülse*, Zeitschr. f. d. ges. Med. **30**. — 10) *Derselbe*, ebendaselbst **39**. — 11) *Hülse* und *Strauss*, ebendaselbst **99**. — 12) *Hetényi*, Orvosképzés 1924, Balints Nummer. — 13) *Ernst Weiss*, Wien. klin. Wochenschr. 1921. — 14) *Duzár* und *Fritz*, Ung. Med. Arch. 1924, 2. Heft. — 15) *Holló* und *Weiss*, ebendaselbst 1924, 4. Heft u. diese Zeitschr. **144**. — 16) *Bang*, Der Blutzucker, 1913. — 17) *W. Trendelenburg*, Ergebn. d. Physiol. 1923. — 18) *Derselbe*, ebendaselbst 1923. — 19) *Pick*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **42**.

Über den Blutchemismus bei parenteraler Anregung der Tätigkeit der Verdauungsdrüsen, besonders des Magens.

Von

Kantaro Onohara (Osaka).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 7. Februar 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In einer früheren Arbeit (1) habe ich durch Versuche am Hunde gezeigt, daß in den ersten 3 Stunden nach einer die Magensekretion kräftig anregenden Fütterung mit Fleisch oder Kohlehydrat folgende Veränderungen am Blutchemismus festzustellen sind: 1. der Wassergehalt des Blutes zeigt unter gewissen Schwankungen eine ausgesprochene Tendenz zur Zunahme, 2. der Chlorgehalt des Blutes weist das gleiche Verhalten auf. Daraus wurde geschlossen, daß infolge der digestiven Reizung vorzüglich der Magenschleimhaut und der sich an sie anschließenden Sekretionsprozesse in überkompensatorischer Weise ein starker Wasserstrom mit einem Transport von Kochsalz aus den Geweben in das Blut stattfindet, und daß wahrscheinlich dabei auch Kochsalz aus den sogenannten trockenen Depots entleert wird.

Angesichts dieser Erfahrungen drängte sich die Frage auf, durch welchen Mechanismus das Gewebswasser und das Kochsalz bei der Tätigkeit der Verdauungsdrüsen aus den Geweben abgerufen wird.

Wäre lediglich die Tatsache der Sekretion der Verdauungsdrüsen genügend zur Erklärung dieser Phänomene, dann dürfte es keinen Unterschied machen, ob die Sekretion durch eine Nahrungsingestion vornehmlich reflektorisch ausgelöst wird, ob überhaupt durch Anfüllung des Magen-Darmkanals mit Ingesta eine Reizung der sensiblen Schleimhautnerven gesetzt wird, ober ob bei leerer Magen- und Darmhöhle ohne reflektorisch-nervöse Reizung und überhaupt ohne Reizung der sensiblen Schleimhautnerven, abgesehen von der durch die darüberrinnenden Verdauungssäfte bedingten, die Sekretine durch eine direkte

chemische Reizung der sekretorischen Zentren oder der Nervenendigungen oder der Zwischensubstanzen oder der Drüsenzellen selbst die Sekretion hervorgerufen wird. Wenn aber bei dieser verschiedenartigen Versuchsanordnung ein unterschiedliches Verhalten im Blutchemismus auftrat, wenn bei der zuletzt genannten Versuchsanordnung die oben beschriebenen Reaktionen am Blutchemismus ausblieben, dann war es wahrscheinlich, daß die bei enteraler Nahrungszufuhr beobachtete *über*kompensatorische Wasser- und Kochsalzausschwemmung ihren Grund in der starken sensiblen Reizung der Magen-Darmschleimhaut durch die Ingesta haben mußte.

Die parenterale Anregung der Sekretion nahm ich durch subkutane Sekretininjektion [Brennesselsekretin, *Dobreff* (2)] oder durch subkutane Pilocarpininjektionen oder durch intravenöse oder subkutane Acetylcholininjektionen vor. Zweimal gab ich auch den nüchternen Hunden eine subkutane Atropininjektion und beobachtete danach den Blutchemismus.

Die Versuchsanordnung war derart, daß die Hunde dauernd bei ungefähr der gleichen Fütterung gehalten wurden. Vor jedem Versuch blieben sie 16 Stunden nüchtern. Danach wurde vor der Injektion der betreffenden Pharmaka eine Blutanalyse gemacht, und diese wurde nach der Injektion der Pharmaka in halbstündlichen Intervallen wiederholt, und zwar während der ersten 3 Stunden nach der Injektion.

Das Kochsalz wurde nach der *Bang*schen Methode bestimmt. Die Trockensubstanz, um möglichst genaue Resultate zu bekommen, nach der Makromethode in etwa 100 mg Blut, indem ich das Blut in ein mit einem Trockengläschen vorher gewogenes Fließpapierstück aufnahm. Dann wurde das Gläschen mit seinem Inhalt sofort und wieder nach der Trocknung bis zum konstanten Gewicht gewogen.

Nach einer kräftigen *Pilocarpindosis* stieg die Trockensubstanz rapide und steil an und hielt sich während der folgenden 3 Stunden auf übernormaler Höhe, wenn auch allmählich ein Abfall von dem ursprünglich erreichten Gipfelpunkt eintrat. Der Kochsalzgehalt des Blutes sank zuerst etwas und blieb dann auf diesem Werte stehen oder stieg wieder etwas an, um im günstigsten Falle den Ausgangswert vor der Pilocarpininjektion wieder zu erreichen. Das gilt ebensowohl für die Berechnung auf das frische Blut, wie auf die Bluttrockensubstanz. Es erklärt sich also die Kochsalzabnahme ungezwungen aus der Verarmung des Blutes an Blutwasser, in dem ja das Kochsalz vorzüglich gelöst ist.

Nach der *Acetylcholininjektion* trat ebenfalls eine Zunahme der Trockensubstanz auf, aber sie war bedeutend geringer als nach der Pilocarpininjektion. Man muß dabei an die stärkeren Wasserverluste bei der Pilocarpinwirkung schon allein durch die gewaltige Salivation und die längere Dauer der Wirkung denken. Der Kochsalzgehalt des Blutes bei Berechnung auf das frische Blut sank entweder eine Spur

oder nahm eine Spur zu, blieb bei der Berechnung auf die Trockensubstanz aber fast unverändert; nur in den Perioden starker Erhöhung der Trockensubstanz war er leicht gesenkt.

Nach der Injektion von *Brennesselsekretin*, das in den gewählten Dosen eine fudroyante Magensekretion macht, trat eine Vermehrung in der Trockensubstanz auf, die einmal sofort einsetzte und späterhin mit gewissen Schwankungen noch blieb, einmal aber erst nach einer vorübergehenden Senkung zur Beobachtung kam. Die Vermehrung der Trockensubstanz war nach der Brennesselsekretininjektion zwar nicht so groß wie nach der Pilocarpininjektion, aber größer als nach der Acetylcholininjektion. Auch *Dobreff* (3) hat diese Steigerung der Bluttrockensubstanz nach der Brennesselsekretininjektion gesehen. Der Kochsalzgehalt des Blutes zeigte sowohl bei der Berechnung auf das frische Blut, wie bei der Berechnung auf die Trockensubstanz keine nennenswerten Änderungen. Nur in den Zeiten, da die Trockensubstanz besonders stark erhöht war, war der Kochsalzgehalt leicht gesenkt.

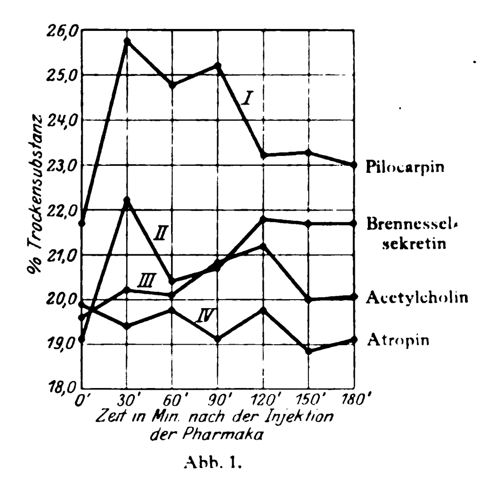


Abb. 1.

Mögen auch die Ausschläge bei den Versuchen mit den verschiedenen Pharmaka verschieden groß sein, so ist doch allen folgendes gemeinsam:

1. *der Wassergehalt des Blutes nimmt, wenn auch unter gewissen Schwankungen, im allgemeinen ab;*
2. *der Kochsalzgehalt des Blutes ändert sich im allgemeinen in dem Sinne mit dem Wassergehalt, daß das wasserärmere Blut auch kochsalzärmer ist; eine Steigerung des Kochsalzgehalts des Blutes, auf die Trockensubstanz berechnet, über den Normalwert kommt so gut wie nie vor.*

Daraus geht hervor, daß bei der parenteralen Anregung der Drüsensekretion das Blut Wasser und die in dem Wasser entsprechende Kochsalzmenge verliert. Ein gewisser Ersatz dieses kochsalzhaltigen Wassers aus dem Gewebe findet statt, denn die starken Eindickungen des Blutes sind vorübergehend; aber es kommt nie zu einer abnormen Verdünnung des Blutes und zu einer übernormalen Kochsalzvermehrung des verdünnten Blutes, wie wir es bei dem Versuch mit enteraler Anregung

der Drüsensekretion gesehen haben. Der überkompensatorische Wasser- und Kochsalzstrom aus den Geweben bleibt aus.

Man könnte nun daran denken, daß hier eine hemmende Gewebswirkung der injizierten Pharmaka vorliege. Die angewandten Substanzen haben wohl eine blutgefäßerweiternde Wirkung; der Blutdruck sinkt; das Herz steht unter der Wirkung der parasympathischen Vagusreizung. Das alles wird der Aufnahme des Wassers und Kochsalzes aus dem Gewebe kaum hinderlich sein. ebensowenig der Wasserspeisung des Gewebes vom Blute aus, weil niedriger Blutdruck eher zur Ödembildung führt. Bei der enteralen Reizung der Drüsen, also während der Verdauung, steigt der Blutdruck, die Kreislaufverhältnisse sind also eher die umgekehrten. Die Frage muß darum folgendermaßen formuliert werden:

Ist der überkompensatorische Erguß von Wasser und Kochsalz aus den Geweben bei der enteralen Reizung der Drüsen die Folge der bei der Verdauung sich einstellenden Änderungen im Kreislauf oder ist sie eine Folge einer Reflexwirkung von der Schleimhaut des Magen-Darmkanals auf die Gewebe selbst?

Und für das *Ausbleiben* dieser überkompensatorischen Reaktion bei parentaler Anregung der Sekretionen durch die parasympathicotropen Pharmaka und das Brennesselsekretin würde die Frage so zu formulieren sein:

Handelt es sich um das Ausbleiben von Reflexwirkungen von der Schleimhaut des Magen-Darmtraktus aus auf das Gewebe oder um direkte inhibitorische Wirkungen dieser Pharmaka auf das Gewebe selbst oder endlich um das Fehlen von den bei enteraler Drüsenreizung normalerweise eintretenden und hier davon abweichenden Kreislaufsveränderungen als ätiologische Momente?

Eine Beantwortung dieser Frage muß weiteren Untersuchungen überlassen werden.

Es ist endlich hier noch zu bemerken, daß nach starken Atropindosen auch beim nüchternen Tiere die Bluttrockensubstanz leicht abnimmt, der Kochsalzgehalt dementsprechend leicht in die Höhe geht. Atropin unterdrückt ja alle Sekretionen.

Literatur.

1) *Onohara*, Über den Blutchemismus während der Tätigkeit der Verdauungsdrüsen. Diese Zeitschr. **154**, 1924. — 2) *Dobreff*, Über ein neues Sekretin in der Brennessel. Münch. med. Wochenschr. **1924**, Nr. 24. — 3) *Derselbe*, Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung von Pflanzensekretinen auf die Blutzusammensetzung. Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **44**, 1925.

Experimenteller Teil.

Versuchsprotokolle 1.

Nr		Minuten	Trockensubstanz Proz.	NaCl Proz. frisches Blut	NaCl pro 100 Trockensubstanz	Bemerkungen
1	21. X. Hund Nr. 5	0	19,1	0,485	2,53	
	etwa 10 kg	30	22,2	0,473	2,13	
	Brennesselsekretin	60	20,4	0,472	2,31	
	2,5 ccm Subkutan-	90	20,7	0,477	2,30	
	injektion	120	21,8	0,486	2,22	
		150	21,7	0,482	2,22	
		180	21,7	0,489	2,25	
2	21. X. Hund Nr. 4	0	18,4	0,480	2,60	Magensaft:
	etwa 11 kg	30	18,4	0,480	2,60	32,0 ccm
	Brennesselsekretin	60	18,0	0,471	2,60	43,0 „
	2,5 ccm Subkutan-	90	18,4	0,478	2,59	46,0 „
	injektion	120	19,0	0,464	2,44	27,0 „
		150	18,2	0,478	2,62	7,0 „
		180	18,0	0,472	2,60	3,0 „
3	13. X. Hund Nr. 5	0	21,7	0,467	2,15	Speichelfluß.
	1,0 proz. Pilocarpin-	30	25,8	0,429	1,66	Tränenfluß.
	lösung 1,0 ccm	60	24,8	0,449	1,81	Diarrhöe
	Subkutaninjektion	90	25,2	0,456	1,81	
		120	23,2	0,441	1,90	
		150	23,3	0,450	1,93	
		180	23,0	0,457	1,98	
4	19. XII. Hund Nr. 7	0	19,8	0,499	2,52	Erbrechen,
	etwa 11,8 kg	30	23,3	0,459	1,97	Speichelfluß,
	1,0 proz. Pilocarpin-	60	23,7	0,460	1,94	Diarrhöe
	lösung 1,0 ccm	90	24,6	0,462	1,87	
	Subkutaninjektion	120	24,1	0,461	1,91	
		150	23,5	0,474	2,01	
		180	23,4	0,472	2,01	
5	15. X. Hund Nr. 5	0	21,8	0,482	2,21	Schock nach
	0,1 proz. Atropin-	30	23,8	0,441	1,85	der Injektion
	sulfat	60	21,6	0,462	2,13	
	1,0 ccm Subkutan-	90	21,5	0,462	2,14	
	injektion	120	21,4	0,447	2,08	
		150	21,3	0,455	2,13	
		180	21,2	0,460	2,16	
6	19. X. Hund Nr. 4	0	19,9	0,489	2,45	
	0,1 proz. Atropin-	30	19,4	0,491	2,53	
	sulfat	60	19,8	0,494	2,49	
	0,8 ccm Subkutan-	90	19,1	0,495	2,59	
	injektion	120	19,8	0,493	2,43	
		150	18,9	0,494	2,61	
		180	19,1	0,493	2,58	

Versuchsprotokolle 2.

Nr.		Minuten	Trockensubstanz Proz.	NaCl Proz. frisches Blut	NaCl pro 100 Trockensubstanz
7	12. XII. Hund Nr. 7	0	19,6	0,502	2,56
	11,800 kg	30	20,2	0,470	2,32
	1,0 proz. Acetylcholinlösung 0,35 ccm	60	20,1	0,462	2,29
		90	20,8	0,509	2,44
	Intravenöse Injektion	120	21,2	0,500	2,35
	(pro kg 0,3 mg)	150	20,0	0,501	2,50
		180	20,1	0,494	2,45
8	16. XII. Hund Nr. 7	0	20,3	0,483	2,37
	1,0 proz. Acetylcholinlösung 0,7 ccm	30	20,3	0,503	2,47
		60	20,7	0,505	2,43
	Intranucleär-Injektion	90	21,0	0,509	2,42
		120	20,6	0,497	2,41
		150	21,0	0,498	2,36
		180	20,9	0,515	2,46

Über die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten mit Rücksicht auf die Hofmeistersche Ionenreihe.

Von

D. v. Klobusitzky.

(Aus dem physiologischen Institut der k. ungar. Pázmány-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 7. Februar 1925.)

Die Frage der Senkungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen hat in neuester Zeit viele Autoren beschäftigt. Einige, so z. B. *Ehrismann*[1]), *György*[2]), *Raue*[3]), *Radsma*[4]), *Rumström*[5]) usw. untersuchten den Einfluß der Elektrolyte wie auch der Anelektrolyte auf die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten. Die ausführlichen Resultate dieser Untersuchungen gehören nicht in den Bereich dieser Abhandlung, aber so viel möchte ich doch erwähnen, daß nach den Angaben der einzelnen Autoren in der Reihenfolge der Ionen wesentliche Unterschiede vorkommen. So stellt *Ehrismann* das Sulfat in die Mitte, *Rumström* an das Ende, *Raue* an den Anfang seiner Reihe. Hingegen stimmt die von *Radsma* angegebene Ionenreihe mit der *Hofmeister*schen vollständig überein. Das Chlorid steht nur bei *Radsma* am Anfang der Reihe, bei allen anderen oben genannten Autoren steht es zwischen den letzten Gliedern. Ähnliches kann man über die einzelnen Kationen sagen. Allein *György* ausgenommen — der gar keine Einflüsse der Salze und Anelektrolyte auf die Senkungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen finden konnte —, wurde von allen übrigen Autoren behauptet, daß die Elektrolyte, besonders die zu der *Hofmeister*schen Reihe gehörenden Kationen und Anionen, die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten in verschiedenem Maße beeinflussen. Im Laufe

[1]) *G. Ehrismann*, diese Zeitschr. **141**, 531, 1923.
[2]) *György*, ebendaselbst **95**, 71, 1921.
[3]) *F. Raue*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **93**, 150, 1922.
[4]) *W. Radsma*, diese Zeitschr. **89**, 211, 1918.
[5]) *J. Rumström*, ebendaselbst **123**, 1, 1921.

anderer Untersuchungen habe ich mit *Csapó* die Erfahrung gemacht[1], daß die Salze der *Hofmeister*schen Reihe die Gerinnung des Blutes hemmen, und während dieser Versuche bin ich auf die verschiedene Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten in den verschiedenen Salzlösungen aufmerksam geworden.

Die bekannteste Methode, um die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten zu studieren, ist das *Linzenmeier*sche Verfahren; doch habe ich diese meine Untersuchungen statt mit diesem Verfahren mit einer von mir bei den Blutgerinnungsstudien gebrauchten, viel einfacheren Methode durchgeführt. Ich habe nämlich bei den ersten Untersuchungen beobachtet, daß die Wirkung der einzelnen Salze so verschieden ist, daß selbst mit meinem weniger genauen Verfahren brauchbare Resultate erzielbar sind. Außerdem hatte für mich die *absolute Zeit* der Senkung keine Bedeutung, ich wollte nämlich nur die *relativen Zeitintervalle* innerhalb der einzelnen Serien beobachten.

Methodisches.

An den Eprouvetten mit gleichem Durchmesser (18 mm) wurde der Rauminhalt von 10 ccm durch eine Marke bezeichnet und nach sorgfältigem Austrocknen der Röhrchen wurden dieselben mit der entsprechenden Menge des bis Milligramm genau gewogenen, wasserfreien Salzes beschickt. Die Salze wurden in 2 ccm Wasser gelöst und dann die Eprouvetten mit Blut durch eine paraffinierte Kanüle aus der Carotis des Hundes bis zur Marke gefüllt. Das Blut wurde mit den Salzlösungen mit Hilfe eines Glasstabes vorsichtig — um die Schaumbildung möglichst zu vermeiden — durchgemischt. Die so bereitete Serie habe ich bei Zimmertemperatur (18 bis 20° C) längere Zeit stehengelassen und zeitweise die Höhe des Plasmas in den einzelnen Röhrchen mit einem mit Nonius versehenen Tastzirkel gemessen.

Der Einfluß der Anionen (SO_4'', Cl', NO_3', Br', J', SCN') wurde mit Natrium- und Ammoniumsalzen, der der Kationen ($K^{\cdot}$, $Na^{\cdot}$, $Ca^{\cdot\cdot}$, $NH_4^{\cdot}$) mit Jodiden und Chloriden untersucht. Die Konzentrationen der Salze wurden auf Grund der Resultate unserer oben angeführten früheren Untersuchungen so ausgewählt, daß die Gerinnung des Blutes im allgemeinen 48 Stunden lang sicher verhindert blieb. Selbstverständlich war die Salzkonzentration bei allen Gliedern der einzelnen Serien dieselbe, und zwar bei den Anionserien der Ammoniumsalze 0,3, 0,6, der Natriumsalze 0,6, 0,8; bei den Kationserien der Jodide 0,25, der Chloride 0,6 n.

Obzwar das von verschiedenen Hunden stammende Blut eine sehr verschiedene Senkungsgeschwindigkeit zeigte, wiesen die in 16 Fällen durchgeführten Untersuchungen darauf hin, daß die obigen Elektrolyte die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten im Sinne der *Hofmeister*schen Reihe beeinflussen. Die größte Senkungsgeschwindigkeit hatten also unter den Anionen die Sulfate, unter den Kationen das Calcium bewirkt, die übrigen Glieder folgen in der bekannten ($Cl' > NO_3' > Br' > J' > SCN'$; $Na^{\cdot} > K^{\cdot} > NH_4^{\cdot}$) Reihe.

---

[1]) *J. Csapó* und *D. v. Klobusitzky*, diese Zeitschr., erscheint nächstens.

Zwecks Raumersparnis will ich nicht die Tabellen aller Untersuchungen mitteilen, sondern nur je eine von den Kation- und Anionserien.

Tabelle I.

Nr.	Salzlösung	Konzentration	Plasmahöhe war nach 6 Stdn. mm	20 Stdn. mm	30 Stdn. mm
1	$CaCl_2$	0,6 n	11	20	22,5
2	$NaCl$	0,6 n	7	16	21,5
3	KCl	0,6 n	6	12,8	14
4	NH_4Cl	0,6 n	4,5	12	13

Tabelle II.

Nr.	Salzlösung	Konzentration	Plasmahöhe war nach $5^1/_2$ Stdn. mm	12 Stdn. mm	24 Stdn. mm
1	Na_2SO_4	0,8 n	28	33	33
2	$NaCl$	0,8 n	8,8	12,4	21
3	$NaNO_3$	0,8 n	7,2	11,6	14,5
4	NaBr	0,8 n	6,9	10,8	11
5	NaJ	0,8 n	5,9	10	—*)
6	NaSCN	0,8 n	n. $6^1/_2$ Stdn. 4,2	—*)	—*)

*) Das Blut war schon hämolysiert.

Von der Anionenreihe der Ammoniumsalze konnte ich nur das Sulfat, Chlorid, Nitrat und Bromid verwenden, da die übrigen schon innerhalb 6 Stunden eine Hämolyse verursachten.

Zur Bestimmung, ob die Salze die Senkung der Blutkörperchen fördern oder hemmen, habe ich neben den Salzserien immer auch noch im Oxalatblut die Senkung beobachtet (0,05 Natriumoxalat in 2 ccm Wasser gelöst). Die Senkung der roten Blutkörperchen im Oxalat- und Salzblut vergleichend, fand ich, daß die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten im Oxalatblut der am nächsten steht, welche in 0,8 n NaJ enthaltendem Blute zu finden war.

Im weiteren habe ich untersucht den Einfluß auch der Konzentration der einzelnen Salzlösungen auf die Senkung. Aus der Tabelle III ist ersichtlich, daß kleinere Konzentrationen die Senkungsgeschwindigkeit auffallender fördern als größere Konzentrationen.

Tabelle III.

Nr.	Salzlösung	Konzentration	Spezifisches Gewicht bei 19° C	Plasmahöhe war nach $^1/_2$ Std. mm	1 Std. mm	$2^1/_2$ Stdn. mm	$4^1/_2$ Stdn. mm	$6^1/_2$ Stdn. mm	16 Std. mm
1	Na_2SO_4	0,3	1,0225	5	11	17	28,5	—*)	—*)
2	Na_2SO_4	0,6	1,0399	0	2,6	3,7	4,9	6,6	12,3

*) Das Blut ist schon geronnen.

Die hypertonischen Salzlösungen beeinflussen also die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten einesteils nach der *Hofmeister*schen Reihe, anderenteils im entgegengesetzten Verhältnis zu ihrer Konzentration.

Die Erklärung der *Hofmeister*schen Ionenreihe ist nach den neuesten physikalischen Forschungen nicht nur als der Einfluß auf die Kolloide, sondern auch als auf das Wasser als Lösungsmittel zu suchen. *Eötvös*[1]) hat schon gezeigt, daß die Formel des Wassers nicht einfach H_2O ist, sondern es müssen verschiedene allotrope Modifikationen existieren, deren Formeln Polymere von H_2O sind. Die seitdem durchgeführten Versuche und Beobachtungen haben diese *Eötvös*sche Hypothese bestätigt. Nämlich nach *Bruni* und *Amadori*[2]) ist wahrscheinlich die Formel des Eises $(H_2O)_2$, des flüssigen Wassers $(H_2O)_4$ oder $(H_2O)_6$, des Wasserdampfes H_2O. Weiter wissen wir, daß die Elektrolyte die innere Reibung, die Oberflächenspannung und die Grenzflächenspannung des Wassers nach der *Hofmeister*schen Reihe[3]) beeinflussen. *Eötvös*, *Ramsay*, *Schields*, *Dutoit*, *Friedrich* u. a.[4]) haben in ihren Untersuchungen festgestellt, daß die Oberflächenspannung, also die Molekularoberflächenenergie, abhängig ist von den jeweilig gegenwärtigen allotropen Modifikationen des Wassers; so ist es also sehr wahrscheinlich, daß die *Hofmeister*sche Ionenreihe auch den Übergang der einzelnen allotropen Modifikationen ineinander beeinflußt. Die *Hofmeister*schen Salze verändern also nicht, oder wenigstens nicht ausschließlich die Kolloide, sondern auch das Lösungsmittel selbst. Jedoch kann man den entgegengesetzten Einfluß dieser Salze auf die Blutgerinnung und auf die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten nicht außer acht lassen. Nämlich das die Gerinnung am stärksten hemmende Ion (SCN) verzögert die Senkung der roten Blutkörperchen. *Höber* und die *Höber*sche Schule[5]) haben bewiesen, daß die Senkungsgeschwindigkeit durch die Vermehrung des Fibrinogens oder des Globulins gefördert wird. Aus diesem könnte man schließen, daß die Rhodanide, welche das Fibrinogen am besten stabilisieren, auch am leichtesten die Senkung hervorrufen. Meine Untersuchungen beweisen aber das Gegenteil. Der Unterschied des spezifischen Gewichts bei den einzelnen Salzen ist nicht so groß, daß es als befriedigende Erklärung

---

[1]) *R. v. Eötvös*, Ann. d. Phys. u. Chem. **27**, 448, 1886.

[2]) *Bruni* und *Amadori*, zitiert nach *K. A. Hofmann*, Lehrb. d. anorg. Chem., 4. Aufl., 57. Braunschweig 1922.

[3]) *R. Höber*, Phys. Chemie der Zelle und der Gewebe, 5. Aufl., S. 271. Leipzig 1922.

[4]) *O. D. Chwolson*, Lehrb. der Physik **1**, 609. Braunschweig 1902.

[5]) Siehe zusammenfassend: *Linzenmeier*, Münch. med. Wochenschr. **70**. 1243, 1923.

bestehen könnte. Und es gibt Salze, die trotz eines größeren spezifischen Gewichts eine schnellere Senkung verursachen als andere mit kleinerem spezifischen Gewicht [z. B. das spezifische Gewicht der 0,3 n Na_2SO_4-Lösung ist (bei 19° C) 1,0225, das der 0,3 n NaCl-Lösung 1,0154]. Daraus ist ersichtlich, daß die verschiedene Wirkung der einzelnen Salze weder die spezifischen Gewichtsunterschiede, noch die Annahme von Kolloidwirkungen befriedigend erklären, es scheint, daß nur die endgültige und genaue Kenntnis der Ionenwirkung auf das Wasser zur Lösung dieser Frage führen wird.

Die andere Frage, weshalb die Salzlösungen mit geringerer Konzentration die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten mehr fördern, ist bloß durch die spezifischen Gewichtsunterschiede auch nicht zu erklären. Dagegen sprechen auch die in der Tabelle III mitgeteilten, mit 0,3 n und 0,6 n Na_2SO_4-Lösungen erreichten Resultate. Vergleichen wir die nach 4½ Stunden abgelesenen Plasmahöhen, so ergibt sich, daß die Wirkung der 0,3 n SO_4''-Lösung zur 0,6 n Lösung sich so verhält wie 5,81 : 1, dagegen die spezifischen Gewichte derselben Sulfatlösungen verhalten sich so wie 0,98 : 1. Hier müssen wir wahrscheinlich mit elektrolytischen Erscheinungen rechnen, denn bei Anelektrolyten kommt dieser Unterschied in viel geringerem Maße zum Vorschein, was meine folgenden Untersuchungen mit Rohrzuckerlösungen bestätigen. (Mit Milch- und Traubenzuckerlösungen hatte ich ähnliche Resultate erreicht.) Bei diesen Anelektrolytserien wurde die Gerinnung des Blutes mit 0,05 g Natriumoxalat verhindert.

Tabelle IV.

Nr.	Konzentration Proz.	Spezifisches Gewicht bei 20° C	Plasmahöhe war nach				
			½ Std. mm	1 Std. mm	2½ Stdn. mm	4½ Stdn. mm	16 Stdn. mm
1	2,5	1,0098	7,6	12,5	25,4	30,2	32
2	5	1,0212	7	11,2	17,5	22,4	25,5

Diese Unterschiede erklären sich durch die spezifischen Gewichtsunterschiede und die größere Hypertonie der konzentrierten Lösungen. Aus den Untersuchungen von *Fahraeus*[1]) wissen wir ja, daß die geldrollenförmige Vereinigung der Blutkörperchen infolge der Verkleinerung der Reibungsfläche die Senkung erleichtert; diese Möglichkeit ist bei schwächer hypertonischen Lösungen eher vorhanden als bei stärkeren. Ich wiederhole aber, daß diese Unterschiede bei den Elektrolyten zur Erklärung ungenügend sind. Es scheint, daß hier eine Elektrolytwirkung die Hauptrolle spielt, welche wir uns vielleicht so vorstellen

[1]) *Fahraeus*, The Suspension-Stability of the Blood. Stockholm 1921.

können, daß das Metall des Salzes mit den Plasmaeiweißkörpern in Verbindung tritt und so nur der Säurerest frei bleibt. Dadurch kommt es zur Vermehrung der negativen Ladung, welche eine stabilisierende Wirkung ausübt auf die ebenfalls mit negativer Ladung versehenen Erythrocyten.

Zusammenfassung.

Ich habe den Einfluß hypertonischer Salz- und Zuckerlösungen auf die Senkungsgeschwindigkeit der Erythrocyten untersucht und konnte dabei feststellen:

1. Die Ionen beeinflussen die Senkung der roten Blutkörperchen nach der *Hofmeister*schen Reihe.

2. Dieser Einfluß ist mit der Konzentration der Lösungen umgekehrt proportional. Dasselbe fand ich auch bei den Zuckerlösungen, doch kommt bei diesen der Konzentrationsunterschied weniger zur Geltung.

Über die Methodik der quantitativen Bestimmung des Fibrinogens. III.

Von

W. Starlinger und K. Hartl.

(Aus der II. medizinischen Universitätklinik in Wien.)

(Eingegangen am 9. Februar 1925.)

In zwei vorausgehenden Mitteilungen[1]) konnten hinsichtlich der refraktometrischen, gravimetrischen und kjeldahlometrischen Methodik der Maßanalyse des Fibrinogens (Fg) — dieses als die Gesamtheit der Eiweißkörper betrachtet, welche bei Spontangerinnung nativen Blutplasmas zur Abscheidung gelangen — folgende, für die grundsätzliche Fragestellung ausschlaggebende Befunde erhoben und Folgerungen begründet werden:

I. Die refraktometrische Methodik.

Methodisch-technische Grundlage. Unter der Voraussetzung des Bestehens einer einheitlichen und konstanten spezifischen Refraktion des Fg von gleicher Größe wie die für Serumeiweiß angenommene ($\Delta n_D = 0{,}001\,72$) beträgt der Ablesefehler $\pm$ 0,05 Skalenteile des *Pulfrich*schen Eintauchrefraktometers, bei der Doppelablesung im Rahmen des Differenzverfahrens (Refraktion des Fg = Refraktion des Plasmas — Refraktion des Serums) somit $\pm$ 0,1 Skalenteile, bei Umrechnung auf Grammprozent Eiweiß, entsprechend obiger Voraussetzung, daher rund $\pm$ 0,02 g-Proz. Die experimentelle Prüfung dieser theoretischen Fehlermöglichkeit ergibt, daß der tatsächliche Fehler diesem Wert im allgemeinen entspricht. Die methodisch-technische Grundlage ist somit als hinreichend brauchbar zu bezeichnen.

Methodische Durchführung. Nativplasma (NP) hat den gleichen Brechungswert wie Hirudinplasma, die Berechtigung der Verwendung von Hirudinplasma ist somit erst begründet. Die Anwesenheit von Plättchen beeinflußt den Refraktionswert nicht; Nativserum (NS) hat andere (größere und kleinere) Brechungswerte als Vollblutserum, es darf daher nur NS Verwendung finden; als ideale Methode hat somit die Bestimmung der Differenzrefraktion von NP (oder bei vorhandener Möglichkeit, echtes Hirudin zu verwenden: Hirudinplasma) und NS zu gelten.

Bei Verwendung von Salzplasma (SP) und von mit Hilfe der Rekalzifikation oder 56° Wärmewirkung daraus gewonnenem Salzserum (SS) ergibt die refraktometrische Differenzbestimmung (unter Berücksichtigung der statt-

[1]) *W. Starlinger*, I. Mitteilung diese Zeitschr. **140**, 1923; II. Mitteilung ebendaselbst **143**, 1924.

gehabten Verdünnung) in vielen Fällen geringere Werte als bei Verwendung der nativen Substrate (NP und NS); die Verwendung von SP und SS ist daher in dieser Form nicht statthaft. Der bei Einhaltung bestimmter Bedingungen der Gewinnung des Salzplasmas aus seinem Refraktionswert zu errechnende Brechungswert des NP ist mit dem tatsächlich gefundenen Brechungswert des NP identisch, die Verwendung von SP daher bei Beobachtung der erwähnten Bedingungen seiner Gewinnung auf Grund der dadurch ermöglichten Errechnung der Refraktion des NP und unter Gegenüberstellung von NS statthaft.

II. Die kjeldahlometrische Methodik.

Methodisch-technische Grundlage. Der theoretische Titrationsfehler beträgt bei Verwendung der *Pregl*schen Methodik ± 0,01 ccm n/70 NaOH, der praktische ± 0,05 ccm n/70 NaOH = 0,00001 g N = 0,0000625 g Eiweiß. Im Rahmen des direkten Verfahrens (Verbrennung des ausgefällten Fg) bei Verwendung von 1,0 ccm Plasma entsprechen 0,0000625 g Eiweiß 0,00625 g-Proz. Fg. Die methodisch-technische Brauchbarkeit ist somit als sehr gut zu bezeichnen. Im Rahmen des Differenzverfahrens (Plasma-N — Serum-N = Fg-N) und bei Verwendung von 0,1 ccm P und 0,1 ccm Serum (den größten technisch noch gut verwendbaren Mengen) entsprechen 0,0000625 × 2 = 0,000125 mg Eiweiß 0,125 g-Proz. Fg, die methodisch-technische Grundlage ist somit ungenügend, die Anwendung des Mikrokjeldahlschen Verfahrens also unstatthaft.

Methodische Durchführung. Der Plättchengehalt des NP (der die Refraktion nicht beeinflußt) vergrößert scheinbar die Menge des ausgefällten Fg, Fg aus NP kann daher in direktem Kjeldahlverfahren erst bestimmt werden, wenn es gelingt, plättchenfreies NP darzustellen. Durch Zusatz von Hirudin wird in vielen Fällen ein Teil des Fg so verändert, daß seine Gesamtausfällung durch keinen Eingriff erzielt werden kann, die Verwendung von Hirudinplasma ist somit abzulehnen. Da mit Hilfe der Refraktometrie festzustellen ist, daß, gemessen an dem Ausmaß des Brechungswertes die mittels Rekalzifikation oder 56° Wärmeeinwirkung ausgefällte Fg-Menge in vielen Fällen bedeutend kleiner gefunden wird als die bei Spontangerinnung abgeschiedene, muß, solange die eingangs gegebene Voraussetzung des Bestehens einer einheitlichen und konstanten spezifischen Refraktion des Fg Geltung besitzt, diese Differenz als Folge quantitativen Unterschiedes des aus NP und SP abgeschiedenen Fg aufgefaßt und somit auch die Verwendung von SP und Rekalzifikation (bzw. Wärmefällung) abgelehnt werden.

Das Differenzverfahren braucht auf Grund der bereits nachgewiesenen Unzulänglichkeit nicht weiter besprochen werden, da erst die Umstellung auf im Rahmen eines Makroverfahrens zur Verarbeitung gelangende große Substratmengen eine hinreichende Verbesserung der methodisch-technischen Grundlage gewährleisten könnte, die Verwendung eines Makroverfahrens aber für die meisten biologischen Fragestellungen nicht in Frage kommen kann.

III. Die gravimetrische Methodik.

Methodisch-technische Grundlage. Der tatsächliche Wägefehler beträgt im Rahmen des direkten Verfahrens bei Verwendung der Torsionswage ± 0,0005 g, bei Verarbeitung von 1,0 ccm Plasma mithin ± 0,05 g-Proz., bei Verwendung der gebräuchlichen analytischen Wage und des Wägegläschens ± 0,0001 g, bei Verarbeitung von 1,0 ccm Plasma mithin

± 0,01 g-Proz. Die Leistung des ersten Verfahrens ist somit ungenügend, die des zweiten genügend. Ein gravimetrisches Differenzverfahren wurde bisher nie verwendet und wäre theoretisch auch nur als Makroverfahren denkbar.

Methodische Durchführung. Alle bei Besprechung der methodischen Durchführung der Kjeldahlometrie vorgebrachten Befunde und Folgerungen gelten in gleicher Weise auch für die Gravimetrie.

Nachdem solcherart festgestellt war, daß bei tatsächlicher Geltung der vorausgesetzten einheitlichen und konstanten spezifischen Refraktion das refraktometrische Differenzverfahren einesteils genügend technisch-methodische Genauigkeit besitzt, andererseits als einziges Mikroverfahren die einwandfreie Verarbeitung sowohl nativen Plasmas als besalzten Plasmas ermöglicht, während das kjeldahlometrische und gravimetrische Verfahren zwar eine größere technisch-methodische Zuverlässigkeit, jedoch keine genügende Sicherheit hinsichtlich der methodischen Durchführung aufweisen, blieb zu prüfen, ob die bisher (ohne experimentelle Begründung allzeit angenommene) Einheitlichkeit und Konstanz der spezifischen Refraktion des Fg tatsächlich besteht.

Zu diesem Zwecke war es notwendig, vorher die gravimetrische oder kjeldahlometrische Bestimmung, am besten beide, zu durchaus zuverlässigen Standardverfahren auszugestalten, um sie zur Eichung benutzen zu können.

Die grundsätzlichen Untersuchungen mußten dabei an nativem Substrat, also an NP (bzw. NS) zur Durchführung gelangen, die Verwendbarkeit künstlich veränderter Substrate (Salzplasma) durfte erst nachträglich in Betracht gezogen werden.

Die experimentelle Prüfung der solcherart gegebenen Fragestellung gestaltete sich folgendermaßen:

I. Die gravimetrische Bestimmung im NP.

Die Gewinnung plättchenfreien NP mußte zuerst als einwandfrei durchführbar erwiesen werden. Sie gelingt, wenn die Gerinnung des nativen Blutes 30 bis 45 Minuten aufgehalten werden kann, da in dieser Zeit eine gute Zentrifuge alle Plättchen auszuschleudern imstande ist und damit ein serumklares NP liefert. Die lange Gerinnungsverzögerung aber wird ermöglicht durch Einhaltung sorgsamster Technik, die vom Augenblick des Einstichs in die Vene bis zur Entnahme des fertig zentrifugierten Plasmas jede schädliche Einwirkung auf die native Struktur des Blutes vermeidet. Die Weiterverarbeitung ergibt sich im Rahmen der gravimetrischen Maßanalyse; die von uns eingehaltene Methodik ist folgendermaßen festgelegt:

Es werden aus nicht oder nur anfangs schwach gestauter Armvene mit paraffinierter Spritze und trockener, nicht rostender (wenn möglich Platin-) Nadel mindestens 2,5 ccm Blut entnommen, wobei die Punktion in möglichst kurzer Zeit und unter Vermeidung einer Aspiration einerseits von Gewebesaft, andererseits von Luft erfolgen muß. Das Blut wird (nach vorheriger Entfernung der Nadel) schnell, unter peinlichster Vermeidung von Schaumbildung in eine vorbereitete, frisch paraffinierte, mit paraffiniertem Gummi-

stöpsel verschlossene Eprouvette (wobei der Verschluß erst unmittelbar vor der Beschickung mit Blut entfernt werden darf) gebracht, und zwar so, daß die Eprouvette schief gehalten und das eingespritzte Blut langsam an der Wand herunterrinnt. (Alle diese Maßnahmen, die die Luftstaubverunreinigung möglichst hintanhalten sollen, sind durchaus nötig, wenn die Gerinnung über eine halbe Stunde hinaus verzögert werden soll.)

Nach genauem Verschluß wird die Eprouvette in eine hochtourige Zentrifuge gebracht (die genau ausäquilibriert sein muß und nicht „stoßen" darf) und 30 bis 40 Minuten zentrifugiert. Nach dieser Zeit wird eine beliebige, mindestens aber 1,0 ccm betragende Menge des serumklaren NP mit geeichter Pipette entnommen und in einer gewöhnlichen, gut gereinigten Eprouvette bei Zimmertemperatur der Spontangerinnung, die meist nach wenigen Minuten eintritt und rasch komplett wird, überlassen. Nach frühestens 1 Stunde (oder später) wird (am besten mit einer rostfreien Häkelnadel) das Gerinnsel entfernt (das zurückgebliebene Serum durch spätere Beobachtung auf tatsächlich beendete Gerinnung geprüft), sorgfältig zwischen gehärtetem Filterpapier vom Serumrest abgepreßt, in eine mit Wasser gefüllte kleine Eprouvette überführt und zur Entfernung anhaftender Filterhärchen einige Male unter Wasserwechsel geschüttelt, für einige Stunden im Wasser belassen, für je 30 Minuten in Alkohol und Äther überführt, schließlich in kleinen Wägegläschen mindestens 1 Stunde bei 105° im Trockenschrank getrocknet und nach Abkühlen im Exsikkator gewogen.

Prüfung der Methodik.

1. Der Einfluß der bei Verwendung nicht plättchenfreien NP im Fibringerinnsel eingeschlossenen Plättchen kann unter Umständen so beträchtlich sein, daß er das gewonnene Resultat völlig unverwendbar gestaltet:

Versuchsreihe 1. Das nach vorstehender Methodik ermittelte Gewicht des Fibringerinnsels, das in 5, 15, 45 Minuten lang zentrifugiertem, im ersten Falle sehr trübem, im letzten Falle völlig klarem NP zur Absetzung gelangt, kann bei starkem Plättchengehalt bis zu 0,05 g-Proz. differieren[1].

Die Entfernung der Plättchen erscheint daher dringend begründet.

2. Auf die Veraschung kann verzichtet werden, weil sie mit der gewöhnlichen analytischen Wage unwägbare Rückstände zur Rückwägung bringt (Versuchsreihe 2).

3. Der praktische Fehler, gemessen an der Abweichung der bei Parallelbestimmungen erhaltenen Werte voneinander, ist sehr gering.

Versuchsreihe 3. Bei 22 Parallelbestimmungen *einer* Serie ergab sich einmal eine Abweichung von 0,05, einmal eine Abweichung von 0,03, fünfmal von 0,02, viermal von 0,01 g-Proz., elfmal war die Übereinstimmung in der zweiten Dezimale vollkommen. Die beobachteten Fg-Mengen schwankten zwischen 0,27 und 1,08 g-Proz. Dabei kamen in den meisten Bestimmungen verschieden große Plasmamengen und daher auch verschiedene absolute Fg-Mengen zur Verarbeitung.

[1]) Es möge bemerkt sein, daß eine tabellarische Anführung aus raumtechnischen Gründen auf das notwendigste Mindestmaß beschränkt wurde.

Auf Grund dieser in 95 Proz. der Resultate festgestellten Abweichung < 0,04 g-Proz. kann die Übereinstimmung zwischen Kontrollbestimmungen als sehr gut bezeichnet werden.

4. Der technische und zeitliche Arbeitsaufwand der Methode ist sehr gering, lediglich die plättchenfreie Gewinnung des NP verursacht anfangs einige Schwierigkeiten.

II. Die kjeldahlometrische Bestimmung im NP

erfolgt in durchaus gleicher Weise bis zur Alkohol-Ätherwaschung des Fibringerinnsels, die verständlicherweise als überflüssig wegfällt; das Gerinnsel wird als ganzes verbrannt, sein N-Gehalt in der *Pregl*schen Apparatur bestimmt und mittels des Faktors 6,25 auf Eiweiß umgerechnet.

Prüfung der Methodik.

Versuchsreihe 4. Bei 12 Parallelbestimmungen *einer* Serie kam einmal eine Abweichung von 0,08 g-Proz. (bei einem Gesamtfibrinogengehalt von 1,01 g-Proz.), einmal von 0,03, zweimal von 0,01 g-Proz., achtmal eine volle Übereinstimmung in der zweiten Dezimale zur Beobachtung. Die beobachteten Fg-Konzentrationen schwankten zwischen 0,21 und 1,01 g-Proz. Auch hier gelangten in den meisten Fällen verschieden große Plasmamengen und daher verschieden große absolute Fg-Mengen zur Verarbeitung.

Auf Grund dieser in 92 Proz. der Resultate festgestellten Abweichung < 0,04 Proz. kann die Übereinstimmung als sehr gut bezeichnet werden.

III. Der Vergleich der gravimetrisch und kjeldahlometrisch in NP bestimmten Fg-Mengen.

Versuchsreihe 5. In 35 Parallelbestimmungen *einer* Serie kam einmal eine Abweichung von 0,07, viermal von 0,06, zweimal von 0,05, achtmal von 0,04, dreimal von 0,03, viermal von 0,02, zehnmal von 0,01 g-Proz., dreimal eine volle Übereinstimmung in der zweiten Dezimale zur Beobachtung.

Auf Grund dieser in 80 Proz. der Resultate festgestellten Abweichung < 0,05 g-Proz. kann die Übereinstimmung als hinreichend bezeichnet und die Verwendung der gravimetrischen oder kjeldahlometrischen Fg-Bestimmung als Eichungsverfahren in Betracht gezogen werden.

IV. Der Vergleich der gravimetrisch und refraktometrisch im NP bestimmten Fg-Mengen.

Versuchsreihe 6. In 15 Parallelbestimmungen *einer* Serie kam achtmal eine Abweichung im Sinne: gravimetrisches Fg > refraktometrisches Fg (einmal von 0,14, einmal von 0,06, zweimal von 0,05, zweimal von 0,04, einmal von 0,03, einmal von 0,02, einmal von 0,01 g-Proz.), siebenmal im im Sinne: gravimetrisches Fg < refraktometrisches Fg (zweimal von 0,07, dreimal von 0,02, zweimal von 0,01 g-Proz.) zur Beobachtung.

Auf Grund dieser in 60 Proz. der Resultate festgestellten Abweichung $< 0{,}05$ g-Proz. kann die Übereinstimmung und damit die Brauchbarkeit der refraktometrischen Methodik im NP als im allgemeinen hinreichend, für experimentelle Fragestellungen jedoch, die größtmöglichste Zuverlässigkeit verlangen, als im speziellen unzureichend bezeichnet werden.

V. Die spezifische Refraktion des Fg im NP.

Die gleichzeitige Bestimmung der im Differenzverfahren auf das Fg entfallenden Gesamtrefraktion und der absoluten Fg-Menge im gleichen NP eröffnet die Möglichkeit, Aufschlüsse über die spezifische Refraktion des Fg zu erhalten. Eine andere Möglichkeit besteht nicht, denn der sonst übliche Weg der Reindarstellung in bekannter Lösung und darauffolgender Feststellung ihrer Refraktion und Konzentration kann nicht begangen werden, da es niemals gelingt, aus menschlichem Blutplasma das mit Hilfe entsprechender Neutralsalzsättigung abgeschiedene Fg restlos und ohne wenigstens teilweise denaturierende Veränderung wieder in Lösung überzuführen. Die Bestimmung der Gesamtrefraktion im Differenzverfahren beinhaltet nun die Fehlermöglichkeit, daß beim Gerinnungsvorgang die spezifische Refraktion der Serumeiweißkörper (auf deren bisher in dieser Hinsicht angenommene Qualität hier nicht eingegangen werden kann) eine Veränderung erfährt, die dann in der errechneten Refraktion des Fg zum Ausdruck kommt. Da aber einerseits diese Fehlermöglichkeit experimentell weder begründet — denn eine Bestimmung der spezifischen Refraktion der Serumeiweißkörper vor Eintritt der Gerinnung, also im NP, ist naturgemäß unmöglich —, noch ausgeschaltet werden kann, andererseits aber in vorliegender Fragestellung lediglich zu entscheiden ist, ob im Rahmen der verwendeten Technik eine Umrechnung der erhaltenen Differenzrefraktion in gewichtsanalytische Einheiten auf Grund des Nachweises einer praktisch feststellbaren einheitlich konstanten spezifischen Refraktion des Fg statthaft ist, muß und kann die oben dargetane Experimentellgrundlage genügen.

Die solcherweise durchgeführte Gegenüberstellung der im Differenzverfahren bestimmten Gesamtrefraktion und gravimetrisch bestimmten Konzentration des Fg im NP ergab das in folgender Versuchsreihe angeführte Resultat:

Versuchsreihe 7. Die gravimetrischen Ergebnisse basieren fast durchweg auf Doppelbestimmungen, die meist überdies unter gleichzeitiger kjeldahlometrischer Kontrolle standen. In der letzten Reihe sind die refraktometrisch unter Zugrundelegung der bisher angenommenen und verwendeten spezifischen Refraktion von $\Delta n_D = 0{,}00172$ ($= \Delta n_D$ des Gesamtserumeiweißes nach *Reiss*) errechneten Fg-Werte in Grammprozenten angeführt).

Gravimetrisch bestimmtes Fg in g-Proz.	NP NS $n_D = 1.3\ldots$	Fg $n_D = 0.0\ldots$	Spez. Refraktion des Fg $\Delta n_D = 0.0\ldots$	Refraktometrisch bestimmtes Fg in g-Proz.
0,32	5058 4991	0067	0209	0,39
0,40	5147 5067	0080	0200	0,47
0,26	5058 5010	0048	0185	0,28
0,32	5069 5010	0059	0184	0,34
0,46	4966 4884	0042	0178	0,48
0,39	4962 4893	0069	0177	0,40
0,60	5183 5078	0105	0175	0,61
0,27	5014 4967	0047	0174	0,26
0,50	4914 4832	0082	0164	0,47
0,35	5242 5185	0057	0163	0,33
0,50	4772 4694	0078	0156	0,45
0,47	5040 4969	0071	0151	0,41
0,37	5758 5903	0055	0149	0,32
0,27	5028 4990	0038	0141	0,23
0,60	4851 4772	0079	0131	0,46

Daraus ergeben sich folgende Befunde und Folgerungen: Die ermittelten Werte der spezifischen Refraktion schwanken zwischen 0,00209 bis 0,00131 um einen Mittelwert von 0,00169, der gefundene Mittelwert zeigt zwar eine sehr gute Übereinstimmung mit dem bisher per analogiam willkürlich angenommenen von 0,00174, die Abweichungen im Einzelfalle sind jedoch trotz Berücksichtigung aller möglichen Fehlerquellen zu groß, um die Annahme einer einheitlichen und spezifischen Refraktion der bei Spontangerinnung aus dem NP abgeschiedenen Eiweißkörper zu begründen; eine darauf beruhende Umrechnung in Gewichtseinheiten vorzunehmen, außer wenn Fragestellungen in Betracht kommen, die ihre Schlüsse nur aus größeren Ausschlägen der berechneten Fg-Konzentration ableiten, ist daher nicht statthaft.

Die Größe der spezifischen Refraktion ist unabhängig von der gefundenen Konzentration des Fg und des Gesamtplasmaeiweißes.

Zusammenfassend kann also auf Grund der vorliegenden Befunde festgestellt werden, daß als Standardverfahren bei Verwendung des idealen Ausgangsmaterials (NP) lediglich das gravimetrische (bzw.

kjeldahlometrische) Verfahren in Betracht zu ziehen ist, während das refraktometrische Verfahren nur fakultativ Verwendung finden kann.

VI. Die gravimetrische (kjeldahlometrische) Bestimmung im SP.

Der Versuch, die Möglichkeit und Tauglichkeit der gewichtsanalytischen (bzw. kjeldahlometrischen) Bestimmung auch im SP nachzuweisen, ergab sich aus folgenden Erwägungen: erstens, weil die Gewinnung des plättchenfreien NP, so notwendig sie zur theoretischen Klarstellung der ganzen methodischen Grundlage erforderlich war, für die praktische Methodik vielfach zu große Schwierigkeiten bietet, zweitens, weil die Deutung des eingangs erwähnten quantitativen Unterschiedes der in NP und SP auf das abgeschiedene Fg entfallenden Refraktion zuungunsten der letzteren im Sinne einer quantitativen Differenz der Fg-Mengen einer neuerlichen Prüfung unterworfen werden mußte, da die bereits im NP nachgewiesenen großen Schwankungen a priori um so mehr für das SP Bedeutung gewinnen und so den bisher angenommenen quantitativen Unterschied der Fg-Mengen in einen qualitativen der spezifischen Refraktion verkehren konnten.

Für die praktische Methodik aber würde letztere Erkenntnis bedeuten, daß die eingangs begründete Ablehnung der quantitativen Bestimmung der aus SP ausgefällten Fg-Mengen nur mehr bei Verwendung der refraktometrischen, nicht aber der gravimetrischen (oder kjeldahlometrischen) Methodik Geltung beanspruchen könnte.

Versuchsreihe 8. Plättchenfreies NP wurde einerseits der Spontangerinnung überlassen, andererseits zuerst mit 3,6proz. Na citr.-Lösung, dann mit 1,28proz. $CaCl_2$-Lösung versetzt (1,0 NP + 0,3 Na citr.- + 0,35 $CaCl_2$-Lösung) und so ebenfalls zur Gerinnung gebracht. Das Zeitintervall zwischen Citrat- und Ca-Zusatz schwankte zwischen 5 bis 60 Minuten. Das Gerinnsel wurde in beiden Fällen in gleicher Weise im Sinne der beschriebenen Gewichtsanalyse weiter behandelt. In 26 Bestimmungen kam eine Differenz im Sinne Fg(NP) > Fg(SP) elfmal (einmal von 0,05, einmal von 0,04, zweimal von 0,03, dreimal von 0,02, viermal von 0,01 g-Proz.), dreimal im Sinne Fg(NP) < Fg(SP) (einmal von 0,03, einmal von 0,02, einmal von 0,01 g-Proz.), zwölfmal völlige Übereinstimmung in der zweiten Dezimale zur Beobachtung. Die bestimmten Fg-Konzentrationen schwankten zwischen 0,28 und 1,08 g-Proz.

Versuchsreihe 9. In 11 Parallelbestimmungen aus gleichen Salzplasmen ergab sich siebenmal eine Differenz (einmal von 0,05, viermal von 0,02, zweimal von 0,01 g-Proz.), viermal volle Übereinstimmung in der 2. Dezimale. Eine Abhängigkeit der ausgefällten Fg-Menge vom Zeitintervall zwischen Citrat- und Ca-Zusatz war ebensowenig feststellbar, wie von der Größe der Salzzusätze, sofern deren Relation zueinander den kompletten Ablauf der Gerinnung ermöglichte.

Daraus ergeben sich folgende Befunde und Schlüsse: Die Zuverlässigkeit der Bestimmung in SP, gemessen an der Übereinstimmung von Paralleluntersuchungen, ist ebenso groß wie im NP. Die bei Bestimmung der Fg-Menge im NP und SP sich ergebenden Unterschiede kommen weder häufiger noch in größeren Ausschlägen zur Beobachtung

als bei Parallelbestimmungen im gleichen Medium. Die Abscheidung des Fg aus SP mittels Rekalzifikation ist daher im Rahmen des gravi- (und kjeldahlo-) metrischen Verfahrens durchaus statthaft, die Differenz der absoluten Refraktionsgröße ist somit nicht auf eine solche der quantitativen Fg-Menge beziehbar.

Alle diese aus gravimetrischen Befunden abgeleiteten grundsätzlichen Folgerungen gelten, wie nicht näher ausgeführt zu werden braucht, ebenso für die kjeldahlometrische Analyse, was durch die diesbezügliche Klammerbeifügung angezeigt werden sollte.

VII. Der Vergleich der gravimetrisch und refraktometrisch im SP bestimmten Fg-Mengen und die spezifische Refraktion des Fg im SP.

Da also entsprechend vorstehendem Abschnitt ein quantitativer Unterschied des im NP und SP abgeschiedenen Fg nicht mehr angenommen werden konnte, mußte die Deutung im Sinne einer qualitativen Änderung, also einer Erniedrigung der spezifischen Refraktion des Fg im SP zur experimentellen Prüfung gelangen.

Versuchsreihe 10. Methodisch gilt gleiches wie für Versuchsreihen 7 und 8. Von den in der dritten Kolonne angeführten, auf das Fg entfallenden Brechungswerten entspricht der obere der direkt bestimmten Refraktion, der untere der unter Berücksichtigung der Verdünnung errechneten.

Gravimetrisch bestimmtes Fg in g-Proz.	SP / SS $n_D = 1.3...$	Fg $n_D = 0.0...$	Spez. Refraktion des Fg $\Delta n_D = 0.0...$	Refraktometrisch bestimmtes Fg in g-Proz.
0,26	4350 4322	0028 0054	0207	0,31
0,35	4496 4458	0038 0068	0197	0,40
0,50	4397 4339	0058 0096	0192	0,55
0,27	4567 4533	0034 0047	0174	0,27
0,32	4448 4415	0033 0055	0172	0,32
0,39	4407 4367	0040 0066	0169	0,38
0,50	4283 4237	0046 0076	0152	0,44
0,46	4392 4350	0042 0069	0150	0,40
0,40	4456 4420	0036 0059	0148	0,34
0,47	4430 4388	0042 0070	0148	0,41
0,37	4373 4343	0030 0052	0139	0,30
0,60	4267 4218	0049 0078	0130	0,45
0,60	4507 4463	0044 0073	0121	0,42
0,32	4439 4420	0019 0031	0097	0,18

Daraus ergeben sich folgende Befunde und Schlüsse: 1. Hinsichtlich des Vergleichs der gravimetrisch und refraktometrisch (Voraussetzung: $\Delta n_D = 0{,}00172$) im SP bestimmten Fg-Mengen:

In 14 Parallelbestimmungen einer Serie kam neunmal eine Differenz im Sinne: gravimetrisches Fg > refraktometrisches Fg (einmal von 0,18, einmal von 0,15, einmal von 0,14, einmal von 0,07, viermal von 0,06, einmal von 0,01 g-Proz.), dreimal eine Differenz im Sinne: gravimetrisches Fg < refraktometrisches Fg (dreimal von 0,05 g-Proz.), zweimal volle Übereinstimmung in der zweiten Dezimale zur Feststellung.

Auf Grund dieser in 71 Proz. der Resultate festgestellten Abweichung > 0,04 g-Proz. muß die Übereinstimmung und damit die Brauchbarkeit der refraktometrischen Differenzmethodik zwischen SP und SS im Gegensatz zu dem früher über das refraktometrische Differenzverfahren zwischen NP (bzw. dem aus SP unter Einhaltung bestimmter Bedingungen zu errechnenden Wert des NP) und NS abgegebenen Urteil als durchaus nicht genügend bezeichnet werden.

2. Hinsichtlich der spezifischen Refraktion des Fg in SP: Die ermittelten Werte liegen zwischen 0,00207 und 0,00097 um einen Mittelwert von 0,00164, die Schwankungen sind also größer als die in NP festgestellten, der Mittelwert kleiner, jedoch nicht genügend kleiner, um darauf den Beweis der im vorstehenden postulierten Annahme einer Verminderung der spezifischen Refraktion des Fg im SP gegenüber der im NP zu gründen. Eine Abhängigkeit der spezifischen Refraktion von der Konzentration des Fg und des Plasmagesamteiweißes besteht auch im SP nicht. Da sich einerseits in früheren Arbeiten (l. c.) die zwischen SP und SS zur Beobachtung gelangenden Brechungsdifferenzen, andererseits in dieser Arbeit (Abschnitt VI) die im SP abgeschiedenen Fg-Mengen von den zugesetzten Salzmengen, sofern diese nur in entsprechender Relation hinsichtlich ihres Effekts auf den kompletten Ablauf der Gerinnung stehen, unabhängig erwiesen, kann auch eine an sich mögliche Beeinflussung der spezifischen Refraktion des Fg im SP durch schwankende Mengen der zugefügten Salze ausgeschlossen werden.

VIII. Der Vergleich der im NP und SP zur Feststellung gelangenden spezifischen Refraktion des Fg.

Da der im vorstehenden Abschnitt errechnete Mittelwert des Fg im SP dem im NP festzustellenden zu wenig nachstand, um aus der Differenz sicheren Schluß auf die Verkleinerung der spezifischen Refraktion des Fg im SP ziehen zu können, mußte zur Entscheidung dieser Fragestellung die gleichzeitige Bestimmung der spezifischen Refraktion im NP und SP der gleichen Blutprobe vorgenommen werden.

Versuchsreihe 11.

Methodische Kombination von Versuchsreihen 7 und 10.

Gravimetrisch bestimmtes Fg in g-Proz.	Fg im NP SP $n_D = 0.0\ldots$	Spez. Refraktion des Fg im NP SP $\Delta n_D = 0.0\ldots$	Differenz der spezifischen Refraktionen $n_D = 0.0\ldots$	Refraktometrisch bestimmtes Fg in g-Proz. im NP SP
0,32	0067	0209	0112	0,39
	0031	0097		0,18
0,60	0105	0175	0054	0,61
	0073	0121		0,42
0,40	0080	0200	0052	0,47
	0059	0148		0,34
0,46	0082	0178	0028	0,48
	0069	0150		0,40
0,32	0059	0184	0012	0,34
	0055	0172		0,32
0,37	0055	0149	0010	0,32
	0051	0139		0,30
0,39	0069	0177	0008	0,39
	0066	0169		0,38
0,50	0078	0156	0004	0,45
	0076	0152		0,44
0,47	0071	0151	0003	0,41
	0070	0148		0,41
0,60	0079	0131	0001	0,46
	0078	0130		0,46

Daraus ergeben sich folgende Befunde und Schlüsse: In zehn Parallelbestimmungen *einer Serie* kam fünfmal eine Differenz der im NP und SP beobachteten spezifischen Refraktion des Fg im Sinne: spezifische Refraktion (NP) $>$ spezifische Refraktion (SP) und $> n_D = 0{,}000\,10$ zur Feststellung, welche die Unterschiede der absoluten auf das Fg entfallenden Refraktionswerte bzw. der (unter Voraussetzung gleicher spezifischer Refraktionen: $\Delta n_D = 0{,}001\,72$) daraus in Gramm-Prozente umgerechneten Eiweißwerte erklärt.

Bei genauer Erwägung ergibt sich jedoch, daß dieser im Differenzverfahren vielfach nachgewiesene Unterschied zwischen den auf das im NP und SP abgeschiedene Fg entfallenden absoluten Refraktionswerten tatsächlich nicht mit Sicherheit auf eine durch den Salzzusatz hervorgerufene Veränderung der spezifischen Refraktion des Fg bezogen werden kann, vielmehr die Ursache dafür in der schon früher (Abschnitt V) erwähnten (nicht ausschaltbaren und für die praktisch methodischen Folgerungen auch gleichgültigen) Fehlermöglichkeit des Differenzverfahrens an sich begründet liegen könnte. Denn da in den vorausgehenden Arbeiten (II. Mitteilung) nachgewiesen werden konnte, daß aus dem unter bestimmten Bedingungen gewonnenen Refraktionswert des SP der Refraktionswert des NP zu errechnen ist und dieser in der Tat mit dem gefundenen des NP übereinstimmt, kann eine durch den gerinnungsverhindernden Salzzusatz bewirkte Veränderung (Verkleinerung) der spezifischen Refraktion des Fg ausgeschlossen werden. Die Veränderung derselben müßte also erst während des Ablaufs der Gerinnung zur Ausbildung kommen, wo sie methodisch

nicht erfaßt werden kann. Die methodische Feststellung gelingt erst wieder nach Ablauf der Gerinnung durch Bestimmung der Brechung des SS und in-Beziehung-bringen derselben zum vorher beobachteten Refraktionswert des SP. Da nun im Rahmen des letzteren die Verschiebung der spezifischen Refraktion sicher noch nicht stattgefunden hat, die Differenzrefraktion zwischen SP und SS aber einen zu kleinen Wert ergibt, kann dieser nur die Folge einer Vergrößerung der Gesamtrefraktion des SS sein. Da solche Veränderungen aber lediglich im Rahmen der Eiweißkörper ablaufen können — denn alle anderen vorhandenen Stoffe könnten keine Einwirkung in solch einem Ausmaße ausüben —, und eine quantitative Zunahme der Serumeiweißkörper (auf Grund nicht kompletter Fg-Abscheidung) nicht angenommen werden kann, weil die Fg-Abscheidung nachgewiesenermaßen komplett abläuft, bleibt nur der Schluß auf eine während des Gerinnungsablaufs zustandegekommene Veränderung (und zwar Erhöhung) der spezifischen Refraktion des Serumeiweißes möglich. Ob nun mit dieser nachgewiesenen und durch den Gerinnungsablauf bedingten Verschiebung der spezifischen Refraktion des Serumeiweißes im Sinne einer Erhöhung eine Verschiebung der spezifischen Refraktion des Fg einhergeht, ist wahrscheinlich — denn, wenn der Gerinnungsablauf schon im Serumeiweiß solche tiefgreifenden Veränderungen zu bewirken vermag, um wieviel mehr muß sich seine Einflußnahme auf das unmittelbare Erfolgsubstrat, das Fg, erstrecken —, jedoch experimentell nicht prüfbar und daher auch keiner Entscheidung zugänglich.

Für die vorliegende Fragestellung, die in erster Linie methodische Gesichtspunkte zu berücksichtigen hat, finden diese Veränderungen jedenfalls in einer scheinbaren Verkleinerung der spezifischen Refraktion des Fg ihren Ausdruck und müssen in diesem Sinne gewertet werden.

Damit scheint die Gesamtkritik der auf gravimetrischer, kjeldahlometrischer und refraktometrischer Grundlage beruhenden maßanalytischen Methodik der Bestimmung des Fg beendet, wobei noch bemerkt sei, daß von einer nochmaligen punktmäßigen Zusammenfassung, welche nur eine Wiederholung bedeuten würde, mit Bedacht Abstand genommen wurde.

IX. Grundsätzliche Kritik der auf anderer technisch-methodischen Grundlage beruhenden Verfahren.

Als solche kommt in Betracht:

1. die Interferometrie,
2. die Polarimetrie,
3. die Diaphanometrie,
4. die Nephelometrie,
5. die Kolorimetrie.

Zu 1. Die Interferometrie beruht auf der Bestimmung des Brechungsvermögens und unterscheidet sich von der gewöhnlichen Refraktometrie durch eine bedeutend größere Genauigkeit der Ablesung. Eine auf Grundlage der Interferometrie ausgearbeitete Methodik der quantitativen Bestimmung des Fg liegt in der Literatur nicht vor; sie könnte, wie die gewöhnliche Refraktometrie, nur im Rahmen des Differenzverfahrens zwischen

Plasma und Serum zur Durchführung kommen und müßte solcherweise die gleiche Unzulänglichkeit der methodischen Durchführung besitzen wie diese, so daß die größere technisch-methodische Leistungsfähigkeit nicht zur Auswirkung gelangen könnte.

Von einem auf interferometrischer Grundlage ausgearbeiteten Verfahren ist daher nichts zu erwarten.

Zu 2. Die Polarimetrie beruht auf der Bestimmung des Drehungsvermögens. Ein auf polarimetrischer Grundlage ausgearbeitetes Verfahren zur quantitativen Fg-Bestimmung ist nicht bekannt. Es könnte ebenfalls nur im Rahmen des Differenzverfahrens zwischen Plasma und Serum Verwirklichung finden und müßte sich auf das Bestehen einer einheitlichen und konstanten spezifischen Drehung des Fg stützen. Untersuchungen über letztere Fragestellung liegen hinsichtlich menschlichen Fg überhaupt nicht, hinsichtlich tierischen Fg durchaus unzulänglich und widersprechend vor: Die spezifische Drehung beträgt nach *Mittelbach*[1]) (vier Bestimmungen an aus Pferdesalzplasma mit NaCl ½ Sättigung abgeschiedenem Fg, in Lösungskonzentrationen von 0,20 bis 0,53 g-Proz.), $(\alpha)_D = -50{,}6$ bis $-54{,}1^0$, im Mittel $-52{,}0^0$, nach *Hermann*[2]) (eine Bestimmung am gleichen Material) $(\alpha)_D = -44{,}6^0$, nach *Cramer*[3]) (vier Bestimmungen an Rindersalzplasma in gleicher Weise wie *Mittelbach*, in Lösungskonzentrationen von 0,27 bis 0,43 g-Proz.) $(\alpha)_D = -35{,}2$ bis $37{,}7^0$, im Mittel $-36{,}4^0$. Es müßte also vorerst das Bestehen einer einheitlichen und konstanten Drehung menschlichen Fg nachgewiesen werden, doch ist ein Ausfall dieser Untersuchungen im bejahenden Sinne namentlich im Hinblick auf die Notwendigkeit der Verwendung von SP nicht zu erwarten. Dazu kommt, daß eine genügende Durchsichtigkeit von Plasma und Serum im Polarisationsapparat erst durch drei- bis sechsfache Verdünnung ermöglicht wird, was eine solche Verminderung der absoluten Fg-Konzentration bewirkt, daß die Fehlermöglichkeit zu sehr anwächst.

Ein auf polarimetrischer Grundlage aufgebautes Verfahren wird daher, selbst im Falle des unwahrscheinlichen Bestehens einer einheitlich konstanten spezifischen Brechung wenig leistungsfähig sein.

Zu 3. Die Diaphanometrie beruht auf der direkten Trübungsmessung mit Hilfe einer Standardtrübung. Ein auf diaphanometrischer Grundlage aufgebautes Verfahren zur quantitativen Fg-Bestimmung ist nicht bekannt. Orientierende eigene Untersuchungen ergaben bei Verwendung des *Plesch*schen Chromophotometers und *Authenriet*schen Kolorimeters (wobei sich ersteres trotz seiner hervorragenden Optik letzterem in der Messung von Trübungen nicht überlegen zeigte) und Erzeugung einer homogenen, stabilen Trübung nach *Rona* und *Kleinmann*[4]) mit Hilfe 25proz. HCl und 10proz. Sulfosalicylsäure eine technisch-methodische Zuverlässigkeit von höchstens 0,05 g-Proz.; daraus aber folgt unmittelbar die Unmöglichkeit der Anwendung des Differenzverfahrens. Die Unmöglichkeit der Bestimmung des durch Spontangerinnung aus NP oder durch Rekalzifikation aus SP abgeschiedenen Fg ergibt sich aus der Tatsache, daß die direkte

---

[1]) *Mittelbach* Zeitschr. f. physiol. Chem. **19**, 1894.
[2]) *Herrmann*, ebendaselbst **11**, 1887.
[3]) *Cramer*, ebendaselbst **23**, 1897.
[4]) *Rona* und *Kleinmann*, diese Zeitschr. 1923, S. 40.

Verarbeitung des gewonnenen Gerinnsels daran scheitert, daß es nicht gelingt, es in eine homogen-stabile Trübung (etwa als Acidalbuminat) überzuführen. Es bliebe also nur die Möglichkeit, das durch 28 Vol.-Proz. Sättigung mit gesättigter Am_2SO_4-Lösung ausgefällte Eiweiß aufzulösen und in oben zitierter Weise homogen-stabil zu fällen. Doch kommt dabei, abgesehen von der nur fakultativen Verwendbarkeit der Resultate infolge der hohen technisch-methodischen Fehlerquelle nicht nur das Fg, sondern auch das Fibrinoglobulin, dem eine gleiche obere Fällungsgrenze gegenüber gesättigter Am_2SO_4-Lösung eigen ist, zur Bestimmung.

Die diaphanometrische Maßanalyse des Fg könnte also nur im direkten Verfahren unter gleichzeitiger Mitbestimmung des Fibrinoglobulins und einer so hohen Fehlermöglichkeit, daß nur große Ausschläge verwendet werden können, Verwendung finden.

Zu 4. Die Nephelometrie beruht auf der Messung des Beugungsververmögens, ihre methodisch-technische Grundlage ist bei Einhaltung ihres physiko-chemischen Grundgesetzes, das den Vergleich nur gleichdisperser, homogen-stabiler Trübungen verlangt, sehr zuverlässig. Die Ungenauigkeit der quantitativen Eiweißbestimmung beträgt nach den Untersuchungen *Rona* und *Kleinmann* (l. c.) bei Erzeugung der homogen-stabilen Trübung mittels HCl-Sulfosalicylsäure (1 Teil 100fch mit 0,9proz. NaCl-Lösung verdünntes Serum + 1 Teil 25proz. HCl + 2 Teile 10proz. Sulfosalicylsäure) und Verwendung des nach den Angaben *Kleinmanns* konstruierten Nephelometers von *Schmidt* und *Haensch*-Berlin[1]) unter den günstigsten Bedingungen nur 0,003 g-Proz. Die technisch-methodische Zuverlässigkeit ist also genügend groß, um die Durchführung des Differenzverfahrens zwischen (plättchenfreiem) NP und NS oder SP und SS zu erlauben. Da uns derzeit ein Nephelometer nicht zur Verfügung stand, konnte an die experimentelle Ausführung dieser Möglichkeit bisher nicht gegangen werden.

In der Literatur liegt nur eine Angabe über die nephelometrische Maßanalyse des Fg von *Rusznyák* und *Barát*[2]) vor: Es wird die Trübung des Fg (0,4 SP + 25,0 ccm einer 27 vol.-proz. gesättigten Am_2SO_4-Lösung) mit der Trübung des Gesamtplasmaeiweißes (0,1 SP + 50 ccm n/5 HCl-gesättigte Am_2SO_4-Lösung aa) unter Berücksichtigung der verschiedenen Verdünnung verglichen und aus dem Verhältnis Gesamteiweiß - Fg unter gravimetrischer Standardeichung die absolute Fg-Konzentration in Grammprozenten unter Angabe einer Fehlermöglichkeit von 10 Proz. errechnet. Das Prinzip der Methode wurde von *Rona* und *Kleinmann*[3]) unter Hinweis einerseits auf die Nichtbeachtung des oben erwähnten Grundgesetzes der Nephelometrie, andererseits auf die Instabilität der verwendeten Trübung grundsätzlich abgelehnt, von *Rusznyák*[4]) unter Verneinung des Grundgesetzes, Behauptung der Stabilität und Hinweis auf praktisch gute Resultate verteidigt.

Hier soll in Ermangelung eigener experimenteller Erfahrung lediglich festgestellt werden, daß die Instabilität von durch 28 vol.-proz. Sättigung mit gesättigter Am_2SO_4 bedingten Fg-Fällungen im Rahmen anderer

---

[1]) Siehe *Kleinmann*, Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethod. 1924.
[2]) *Rusznyák* und *Barát*, diese Zeitschr. **141**, 1924.
[3]) *Rona* und *Kleinmann*, ebendaselbst **140**, 1924.
[4]) *Rusznyák*, diese Zeitschr. **144**, 1924.

Untersuchungen öfters beobachtet werden konnte, und daß im Rahmen des Verfahrens von *Rusznyák* neben Fg auch das Fibrinoglobulin zur Bestimmung gelangt.

Ein auf nephelometrischer Grundlage aufgebautes Verfahren läßt also in Anbetracht der bei Verwendung der *Rona-Kleinmann*schen Eiweißtrübung nachgewiesenen großen methodisch-technischen Zuverlässigkeit im Rahmen des Differenzverfahrens und unter gravimetrischer (kjeldahlometrischer) Standardisierung volle Brauchbarkeit erwarten.

Zu 5. Die kolorimetrische Bestimmung beruht auf der Messung der Farbintensität. Ein auf kolorimetrischer Grundlage aufgebautes Verfahren zur Maßanalyse des Fg liegt in der Literatur nicht vor. Eigene auf der Biuretreaktion basierende orientierende Versuche ergaben bei Verwendung des *Authenrieth*schen Kolorimeters eine sichere Überlegenheit gegenüber dem Diaphanometer im Hinblick auf methodisch-technische Zuverlässigkeit. Da weiter die Möglichkeit besteht, daß abgeschiedene Gerinnsel durch Verwandlung in Alkalialbuminat zu lösen und so der Farbreaktion zuzuführen, steht auch dem direkten Verfahren nichts im Wege.

Eine auf kolorimetrischer Grundlage unter Verwendung der Biuretreaktion ausgearbeitete Methodik läßt also im direkten volle, im Differenzverfahren mindestens fakultative Brauchbarkeit erwarten. Die Standardisierung muß ebenfalls mit Hilfe der Gravimetrie (Kjeldahlometrie) erfolgen.

Während also die interferometrische und polarimetrische Methodik für die Maßanalyse des Fg nicht in Frage kommen, liegt für die im Differenzverfahren zur Anwendung gelangende Diaphanometrie die Möglichkeit fakultativer Brauchbarkeit, für die direkte Kolorimetrie die Möglichkeit voller Brauchbarkeit, für die Nephelometrie die Sicherheit voller Brauchbarkeit vor. Doch ist in Hinsicht auf die praktische Verwendbarkeit der Diaphano-, Kolori- und Nephelometrie zu bedenken, daß die Herstellung von Dauerstandardlösungen derzeit (noch) nicht möglich ist, und die daher bei jeder Serienbestimmung notwendige Neueichung mit Hilfe eines Standardverfahrens eine solche zeit- und arbeitstechnische Belastung bedeutet, daß der einzige Vorteil dieser Ersatzmethoden gegenüber den Standardverfahren: die größere zeit- und arbeitstechnische Expeditivität nicht mehr zu Recht besteht. Aus diesem Grunde konnten wir uns bisher auch nicht entschließen, die systematische experimentelle Ausarbeitung der einstweilen nur auf orientierende Untersuchungen aufgebauten, oben ausgeführten Möglichkeiten durchzuführen, und haben sie nur der Vollständigkeit halber zur theoretischen Erörterung gebracht.

Über den Einfluß der Sauerstoffspannung auf den biologischen Oxydationsprozeß.

Von

R. J. Hamburger und A. v. Szent-Györgyi.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Reichsuniversität zu Groningen.)

(Eingegangen am 12. Februar 1925.)

Die ausgedehnten Arbeiten der letzten Jahre haben uns dem Verständnis der biologischen Oxydationsvorgänge wesentlich näher geführt. Im Lichte dieser Literatur erscheint uns heute die „Verbrennung" in der Zelle als ein sehr kompliziertes System verschiedener chemischer Reaktionen. Als einer der wesentlichsten Vorgänge wurde von *H. Wieland* und *Th. Thunberg* die Wasserstoffaktivierung, d. h. Dehydrierung, von *O. Warburg* die Sauerstoffaktivierung erkannt. Bei der Zellatmung scheinen beide Prozesse ineinanderzugreifen und einander zu ergänzen (*A. Fleisch*, *A. v. Szent-Györgyi*). Wie es aber in der letzten Zeit die Analyse der Milchsäureoxydation zeigte[1]), sind Wasserstoff- und Sauerstoffaktivierung nicht nur voneinander prinzipiell verschieden, sondern arbeiten bei der Zellatmung voneinander weitgehend unabhängig. Die zu oxydierende Substanz wird zunächst dehydrierend angegriffen und geht unter Abgabe seines aktivierten Wasserstoffs in sein Oxydationsprodukt über. Hieran schließt sich dann eine zweite Reaktion, die zugleich die große Energiequelle der Zelle darstellt, in der der Sauerstoff in seiner aktivierten Form in Reaktion tritt und den Wasserstoff zu Wasser oxydiert. Wie es die Analyse der Milchsäureoxydation zu zeigen scheint, oxydiert der Sauerstoff nicht unmittelbar den aktivierten Wasserstoff, sondern dieser wird von der Milchsäure zunächst von einer kofermentartigen Substanz, einem Wasserstofftransporteur, übernommen, der den Wasserstoff dann zur Oxydation dem Sauerstoff zuführt. Die Dehydrierung, bei der der Brennstoff oxydiert wird, und die eigentliche

[1]) Diese Zeitschr. 157, 50, 1925.

Oxydation, bei der der Sauerstoff in Reaktion tritt, sind nicht nur prinzipiell, sondern auch räumlich und zeitlich voneinander geschiedene Vorgänge. Wir haben es also bei dieser biologischen Oxydation mit zwei getrennten Reaktionsgruppen zu tun. Aus früheren Versuchen war uns auch bekannt[1]), daß wir im p-Phenylendiamin eine Substanz in Händen haben, bei deren Oxydation keine Wasserstoffaktivierung beteiligt ist, die wir also mit Vorteil zur Untersuchung der zweiten Reaktionsgruppe gebrauchen können.

Die Aufgabe, die wir uns bei vorliegender Arbeit stellten, war die, zu untersuchen, wie sich die zweite oben genannte Reaktionsgruppe, in der der Sauerstoff in Reaktion tritt, zur Sauerstoffspannung verhält, mit anderen Worten, in welcher Weise die Geschwindigkeit dieser Oxydation von der Sauerstoffspannung abhängt.

Der Verband zwischen Sauerstoffspannung und Zellatmung war bereits wiederholt Gegenstand experimenteller Arbeit. So haben *Verzár* und später *Nakamura* den Sauerstoffverbrauch der Muskel im lebenden Tiere bei variierter Sauerstoffspannung gemessen. Wie interessant aber diese Versuche vom physiologischen Standpunkt auch sein mögen, geben sie keine Antwort auf unsere Frage, da sich doch aus einem so außerordentlich komplizierten System keine Konklusionen auf einen elementaren Prozeß ziehen lassen. Dasselbe gilt auch über die Versuche von *Parnas* und später *O. Meyerhof*, der den Sauerstoffverbrauch zerkleinerten Muskelgewebes unter variierter Sauerstoffspannung im Respirometer verfolgte.

Es war deutlich, daß wir zur Annäherung der oben aufgeworfenen Frage ein viel einfacheres System nehmen mußten, in dem der Oxydationsprozeß nicht wie in den soeben genannten Versuchen durch Gärung, Dehydrierung, Wasserstofftransport usw. kompliziert war. Es lag auf der Hand, zu diesem Ende die oben genannte Oxydation des p-Phenylendiamins zum näheren Studium heranzuziehen.

Die nähere Erkenntnis der Reaktionskinetik dieses Oxydationsprozesses, d. h. der Oxydation des p-Phenylendiamins, schien auch darum besonders anregend, da vorangegangene Arbeiten[2]) vermuten lassen, daß diesem oder einem derartigen Oxydationsprozeß für die Zellatmung eine ganz fundamentale Bedeutung zukommt.

Auch der Verband der Oxydationsgeschwindigkeit des Diamins am Muskel und der Sauerstoffspannung bildete bereits wiederholt den Gegenstand früherer Versuche. So finden wir z. B. bei *Battelli* und *Stern*[3]), daß die Oxydationsgeschwindigkeit des Diamins am Muskel von der Sauerstoffspannung sehr weitgehend abhängig ist. Auch einer von uns (*v. Szent-Györgyi*) hat sich gelegentlich mit der-

---

[1]) Diese Zeitschr. **150**, 195, 1924.
[2]) Ebendaselbst **157**, 50, 67, 1925.
[3]) Ebendaselbst **46**, 317, 1912.

selben Frage beschäftigt und kam zu demselben Resultat[1]). Wie es uns aber auf Grund unserer Erfahrungen scheint, läßt sich gegen beide Arbeiten ein sehr wesentlicher Einwand erheben, daß bei diesen Versuchen der Muskel nicht genügend fein verteilt und somit die Diffusion des Sauerstoffs als beschränkender Faktor nicht mit Sicherheit ausgeschlossen wurde[2]).

Wir wiederholten also diese Versuche und trachteten durch eine möglichst feine Verteilung des Muskels die Diffusion des Sauerstoffs als beschränkenden Faktor auszuschließen. Wir arbeiteten also folgendermaßen: Der möglichst sehnen- und fettfreie Zwerchfellmuskel eines soeben getöteten Schweines wurde fein zerhackt, dann mit der 20fachen Menge destillierten Wassers, den Angaben *Thunbergs*[3]) entsprechend, dreimal eine Viertelstunde lang im Schüttelapparat gewaschen. Der gut ausgepreßte Muskel wurde nun in 1proz. Borsäurelösung im Eiskasten aufbewahrt, vor dem Versuch wiederholt kräftig ausgepreßt. Der in Borsäure suspendierte Muskel ließ sich einige Tage hintereinander verwenden. Sank der Sauerstoffverbrauch bei Diaminzusatz auf niedrige Werte, so wurde das Präparat verworfen.

Durch diese Vorbehandlung, d. h. die Waschung, werden dem Muskel alle seine Brennstoffe entzogen. Ein derartig gewaschener Muskel zeigt im Respirometer keinen Sauerstoffverbrauch, so daß also der bei Diaminzusatz gefundene Sauerstoffverbrauch der reinen Oxydation des Diamins entspricht.

Zum Versuch wurden nun 3 g des gewaschenen Muskels in einem kleinen Mörser mit 1 g Glaspulver versetzt und tüchtig zerrieben. Dieses Präparat wurde dann im Laufe des Versuchs in einem Becher auf Eis aufbewahrt.

Zum Versuch wurden nun 0,50 g des Präparats abgewogen, in das Kölbchen des a. a. O.[4]) beschriebenen Respirometers eingeführt und da in 1 ccm Natriumphosphatlösung suspendiert, das eine Konzentration von 0,2 Mol. und ein p_H von 7,2 hatte. Die Suspension wurde am Boden des Respirometers, das eine Oberfläche von 15 qcm hatte, mit einem Glasstäbchen gleichmäßig verteilt. In das Kölbchen eines zweiten, sonst gleichen Respirometers wurde 1 ccm Phosphatlösung ohne Muskel eingebracht. Das eine Seitengefäß beider Respiro-

[1]) Diese Zeitschr. **150**, 195, 1924.

[2]) Dieser Einwand läßt sich auch gegen die obigen Versuche *Meyerhofs* erheben. *Meyerhof* fand ein Ansteigen der Oxydationsgeschwindigkeit mit der Sauerstoffspannung bis zu einem Partialdruck von 60 Proz. Weitere Erhöhung der Spannung habe keinen Einfluß. Dieses Resultat könnte auch durch eine ungenügende Verteilung bzw. O_2-Diffusion erklärt werden.

[3]) Skand. Arch. f. Physiol. **40**, 1, 1920.

[4]) Diese Zeitschr. **157**, 55, 1925.

meter wurde mit 1 ccm 1 proz. p-Phenylendiaminlösung gefüllt, die aus einer salzsauren Stammlösung durch Neutralisation mit NaOH unmittelbar vor dem Versuch hergestellt wurde.

Der Versuch wurde nun folgendermaßen angestellt: Die beiden Respirometer wurden einem *Barcroft*-Differentialmanometer angeschlossen, im Wasserbad (37°) versenkt und da durch einen Motor energisch geschüttelt. Nach 7 Minuten ließen wir das Diamin in den Kolben an beiden Seiten einlaufen und begannen dann 3 Minuten später die Ablesungen der Druckdifferenzen, die 10 Minuten lang um die Minute notiert wurden. Wir haben die Versuche stets paarweise angestellt und den Sauerstoffverbrauch bei verschiedener O_2-Spannung stets mit dem Sauerstoffverbrauch bei atmosphärischer O_2-Spannung verglichen.

Die verschiedenen Gasmischungen wurden in einem großen Gasometer durch Mengen von Luft und reinen Stickstoffs hergestellt. Zur Herstellung reiner O_2-Atmosphäre gebrauchten wir reinen Sauerstoff aus einer Bombe. Das Respirometer wurde stets 2 Minuten lang mit einem kräftigen Strom der betreffenden Gasmischung ausgespült[1]).

Wir wollen der Kürze halber die Resultate tabellarisch zusammenfassen. Wir bezeichnen die atmosphärische Sauerstoffspannung mit $^1/_5$ Atm. und beziehen die weiteren Verdünnungen auf diesen Wert. Reiner Sauerstoff ist als 1 Atm. verzeichnet. Die Zahlen bedeuten den Sauerstoffverbrauch in 10 Minuten in Kubikzentimetern.

Versuchs-Nr.	O_2-Spannung r Atm.				Versuchs-Nr.	O_2-Spannung in Atm.			
	1	$^1/_5$	1 .	$^1/_{20}$		1	$^1/_5$	$^1/_{10}$	$^1/_{20}$
1	142	139	—	—	5	—	129	132	—
2	152	139	—	—	5 a	—	132	132	—
3	165	165	—	—	6	—	99	—	96
4	—	172	152	—	7	—	125	—	128
					8	—	132	—	135

Unter neun Versuchen ist also der Sauerstoffverbrauch bei der höheren und niedrigen Sauerstoffspannung siebenmal praktisch gleich, einmal um etwa 9, das andere Mal um etwa 13 Proz. höher, ein Unterschied, der unserer Ansicht nach noch durch Versuchsfehler bedingt sein konnte. Auf jeden Fall scheint uns prinzipiell der Versuch mit

[1]) Siehe die Zeichnung dieser Zeitschr. 157, 55, 1925. Das Gas wurde im Röhrchen des Seitengefäßes eingeführt. Der geschliffene Stopfen des Seitengefäßes wurde so gedreht, daß das Gas nur in das Kölbchen entweichen konnte, gegen dessen Boden es also senkrecht angeblasen wurde. Dann entwich das Gas durch das lange Rohr. Das hier entweichende Gas wurde noch durch Wasser geleitet, um sich zu überzeugen, daß der kräftige Gasstrom den richtigen Weg nahm.

gleichem Sauerstoffverbrauch mehr zu sagen als der Versuch, wo bei höherer Spannung mehr Sauerstoff verbraucht wurde. In Anbetracht auch der überwiegenden Zahl der Versuche mit gleichem Sauerstoffverbrauch denken wir feststellen zu können, daß die Oxydationsgeschwindigkeit des Diamins im gemessenen Spannungsbereich prinzipiell unabhängig ist von der Sauerstoffspannung.

Im Hämoglobin des Blutes haben wir eine Einrichtung, um die Sauerstoffspannung der Gewebe von der Sauerstoffspannung der Außenwelt unter weiten Grenzen unabhängig zu machen. Es scheint aber im Oxydationsferment noch ein zweiter, ebenso bedeutender Mechanismus vorzuliegen, um nun die Oxydationsgeschwindigkeit in den Zellen selbst von der Spannung unabhängig zu machen. Durch diesen doppelten Mechanismus, Hämoglobin und Oxydationsferment, wird nun versichert, daß, solange noch genügend Sauerstoff anwesend ist, um den Bedarf zu decken, die Oxydationsprozesse ungestört mit derselben Geschwindigkeit laufen und nicht von Augenblick zu Augenblick mit der anwesenden Sauerstoffspannung schwanken.

Diese Unabhängigkeit der Oxydation des Diamins von der Sauerstoffspannung läßt sich kaum anders vorstellen als durch die Annahme, daß das Ferment (ebenso wie das Hämoglobin) zu einer starken Konzentrierung des Sauerstoffs befähigt ist. Einer von uns hat früher gefunden[1]), daß dasselbe auch mit dem Diamin selbst der Fall ist, da die Oxydationsgeschwindigkeit des Diamins auch von der Konzentration des Diamins unabhängig ist. Vielleicht haben wir in der Konzentrierung der beiden in Reaktion tretenden Elemente (Diamin und Sauerstoff) das Wesen der Fermentfunktion zu ersehen?

Zusammenfassung.

Die Oxydationsgeschwindigkeit des p-Phenylendiamins durch den gewaschenen Diaphragmamuskel des Schweines ist im Spannungsbereich von 1 bis $^1/_{20}$ Atm. O_2 von der Sauerstoffspannung unabhängig.

---

[1]) Diese Zeitschr. 157, 67, 1925.

Über die Wirkung der Ionen Ca, K und Mg auf den Sekretionsmechanismus der Magendrüsen.

Von

Y. Mukoyama (Tokio).

(Aus der experimentell-biologischen Abteilung des pathologischen Instituts der Universität Berlin.)

(Eingegangen am 15. Februar 1925.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Die Kationen Ca, K, Mg und Na beherrschen in ihrer Lösung in der Körperflüssigkeit die Erregungsverhältnisse im vegetativen Nervensystem und in den Erfolgsorganen, Muskel- und Drüsenzelle. Darüber liegen zahlreiche Arbeiten in der Literatur vor (1, 2, 3, 4).

Dieser Einfluß der Ionen gipfelt in ihren ursächlichen Beziehungen zur kolloidalen Natur des Eiweißes, zu den elektrischen Ladungen an den Eiweißmolekülen der Zellen und unter anderem ganz besonders auch in ihrem Einfluß auf die Reaktionen an einzelnen Punkten der Zellen, unter denen deren Verknüpfungsstellen mit der Nervenfaser besonders zu beachten sind. So hat *F. Kraus* (1) mit seinen Mitarbeitern zeigen können, daß am isolierten Froschherzen unter dem Einfluß einer relativen Kalium- bzw. Calciumvermehrung die Aciditätsverhältnisse der Zelle sich ändern, daß Kalivermehrung dazu führt, daß der Kolloidelektrolyt OH-Ionen abgibt, Calciumvermehrung aber eine Abspaltung von H-Ionen bewirkt; daß nach peroraler Zufuhr von Kalium bzw. Calcium sich im Harne das Verhältnis der primären und sekundären Phosphate ändert, was darauf hinweist, daß auch im Gesamtkörper Änderungen in den Aciditätsverhältnissen durch diese Ionen hervorgerufen werden. So scheint die Kaliwirkung identisch mit einer Säurewirkung, die Calciumwirkung identisch mit einer Laugenwirkung zu sein.

Zondek (2) hat ferner die Aufmerksamkeit darauf gelenkt, daß in der Regel die Kaliumwirkung mit dem Reizungserfolg der parasympathischen, die Calciumwirkung mit demjenigen der sympathischen Nerven konform geht. Er stellt sich vor, daß die vegetativen Nerven die Kali- bzw. Calciumkonzentrierung in der Zelle an bestimmten Orten und in bestimmter Richtung dirigieren. Überdies beeinflussen natürlich die Ionen auch den Erregungszustand der vegetativen Nervenzellen selbst nach Maßgabe ihrer allgemeinen Beziehungen zu jeglicher Zellfunktion. Es besteht also am vegetativen Nervensystem mit seinen Erfolgsorganen (Muskel- und Drüsenzelle) der Zustand, daß sowohl die Ionenmischung des Milieus zur Funktion der Nervenzellen in Beziehung steht, und daß diese auch ihrerseits die Ionenwanderung im flüssigen Milieu der einzelnen Zellen ihrer Erfolgsorgane dirigieren.

Über den Einfluß der Kationen Ca, K, Mg und Na auf die Magensaftsekretion sind aber bisher nur sehr wenige Erfahrungen gesammelt worden. *Wilenko* (5) fand im hiesigen Laboratorium, daß die intravenöse Injektion einer 20proz. NaCl-Lösung beim *Pawlow*schen Magenblindsackhund eine deutliche Magensaftsekretion bewirkt. Über den Einfluß der drei anderen Kationen, Ca, K und Mg, nach ihrer intravenösen Injektion auf die Saftsekretion dieses Blindsacks war bisher nichts bekannt. Ich habe daher diese Versuche gemacht und habe gefunden, daß beim nüchternen Tiere die intravenöse Injektion kleiner K- und Mg-Mengen eine Magensaftsekretion hervorruft, deren Größe abhängig ist von der Größe der Dosierung der genannten Ionen, daß aber eine intravenöse Ca-Injektion regelmäßig bei einer durch eine gleichzeitige digestive Reizung der Magenschleimhaut ausgelösten Sekretion eben diese Sekretion hemmt. Der Grad der Hemmung geht hierbei ebenfalls parallel mit der Größe der verwandten Ca-Dosis.

Auch die durch psycho-physiologische Prozesse, nämlich durch Necken mit vorgehaltenem Fleisch ausgelöste Sekretion wird durch eine gleichzeitig vorgenommene intravenöse K-Injektion gesteigert, durch eine gleichzeitig vorgenommene Ca-Injektion aber gehemmt.

Mit der Hemmung und der Steigerung der Saftsekretion wird in der üblichen Weise das an der Fistel abfließende Sekret schwächer oder stärker sauer, ohne daß daraus natürlich etwas auf einen verschiedenen Säureprozentgehalt des nativen Saftes im Moment seiner Entstehung geschlossen werden kann. Bei den Calciumversuchen, besonders bei denen mit großen Calciumgaben, war es in vielen Fällen sehr auffallend, daß das spärlich aus der Fistel noch abfließende Sekret lange Zeit eine äußerst schwach saure Reaktion hatte. Es lohnte vielleicht doch der Mühe, einmal zu untersuchen, ob durch Beein-

flussung der Drüsenzellen oder ihres Nervensystems es experimentell möglich ist, eine isolierte oder wenigstens intensivere Sekretionshemmung an den Belegzellen als an den Hauptzellen oder umgekehrt herbeizuführen.

Meine Beobachtungen über die Fermentkonzentration der einzelnen Säfte geben allerdings keinen Anhaltspunkt dafür. Sie zeigen nur, daß der durch die Kaliuminjektion und Magnesiuminjektion erzielte Saft einen mindestens normal großen, vielleicht sogar gesteigerten Pepsingehalt hat.

Zu den Kaliumversuchen ist noch zu bemerken, daß hier die stark excitosekretorisch wirkenden Kaliumdosen schon mit den toxisch wirkenden und das Leben des Tieres bedrohenden Dosen zusammenfallen. Man kann also mit Kalium im allgemeinen überhaupt keine sehr beträchtlichen Wirkungen erzielen, weil man die Dosis nicht genügend steigern kann.

Auf die Magensaftsekretion wirken aber gleichsinnig Na, K und Mg; der Antagonist zu diesen drei Kationen ist das Ca. Bei allen diesen Versuchen handelt es sich um eine Anreicherung der Körpersäfte mit einem bestimmten Ion. Es wird dadurch einmal die gesamte Ionenmischung verändert, andererseits aber auch ein prävalierender Einfluß des injizierten Ions durch eine relative Vermehrung seiner Menge geschaffen.

Über den Angriffspunkt der beobachteten Erregungs- und Hemmungswirkung sagen diese Versuche noch nichts aus. Man kann nur mit Grund annehmen, daß die Wirkung mindestens zum Teil eine peripherische auf die Drüsenzellen, ihre Zwischensubstanz oder die Nervenendigungen an derselben sein wird, aber man wird auch an zentrale Wirkungen auf die Zellen des vegetativen Nervensystems denken müssen. Nähere Aufklärung über diese Fragen soll eine zweite Mitteilung bringen.

Bei den besonders von *Zondek* (2) festgestellten Beziehungen zwischen dem K und dem Parasympathicus einerseits und dem Ca und dem Sympathicus andererseits wird man nicht fehlgehen, wenn man annimmt, daß auch bei den Erscheinungen an der Magensekretion die Kaliumwirkung eine parasympathische und die Calciumwirkung eine sympathische Wirkung ist.

Da nun Na und Mg gleichsinnig wie Kalium in dieser Weise wirken, wird man wohl auch bei ihnen die parasympathische Beeinflussung annehmen dürfen.

Das auffallendste Ergebnis meiner Arbeit ist aber die Konstanz der Hemmungswirkung des Calciums. Wenn man diese Calcium-

wirkung mit der Adrenalinwirkung am *Pawlow*schen Blindsack vergleicht, dann fällt erst recht auf, wieviel regelmäßiger hier das Calcium hemmend wirkt als das Adrenalin, bei dem zwar auch die Hemmungswirkung die Regel ist, aber bei dem man doch gelegentlich auch gar keine eindeutige Wirkung beobachtet. Die einschlägigen Verhältnisse sind ausführlich kürzlich von *Bickel* (6) dargestellt worden. Ich will hier auf diese Fragen nicht näher eingehen, sondern mich nur darauf beschränken, hervorzuheben, daß beim normal innervierten Magen Ca mit steigender Dosis immer stärker hemmend wirkt. Diese Tatsache ist deshalb von großer Bedeutung, weil sie bei den zweifellos vorhandenen Beziehungen der Ca-Wirkung zur Sympathicuswirkung zeigt, daß beim normal innervierten Magen *der Hemmungsnerv für die Magendrüsen sympathischer Natur sein muß*, ein Schluß, zu dem *Bickel* in seiner genannten Arbeit auf Grund anderer Versuche ebenfalls gekommen ist.

Zu beachten ist ferner, daß bei den höheren Calciumdosen gewöhnlich im unmittelbaren Anschluß an die Injektion ein rasch vorübergehender Brechreiz auftrat, der bei den Dosen von 0,1 g $CaCl_2$ pro Kilogramm Körpergewicht dann auch zu einem einmaligen Erbrechen von etwas Mageninhalt (es war bei diesen Versuchen ja stets Wasser oder Fleisch gegeben worden) führte. Die tödliche KCl-Dosis liegt für den Hund zwischen 0,0325 bis 0,035 g KCl pro Kilogramm Körpergewicht. So kann man also bei der Kaligabe nicht so hohe Dosen geben wie mit $CaCl_2$ oder NaCl.

Folgende Abbildungen veranschaulichen die Versuchsergebnisse.

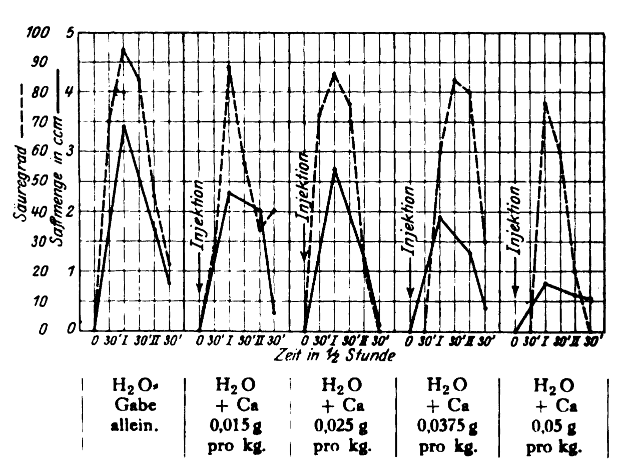
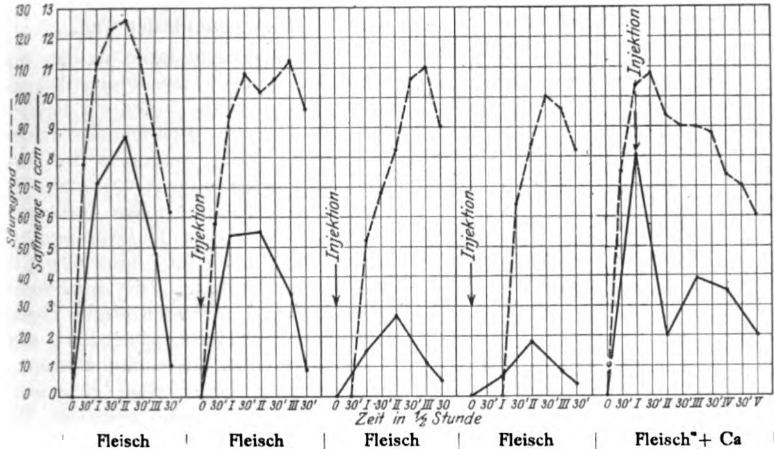
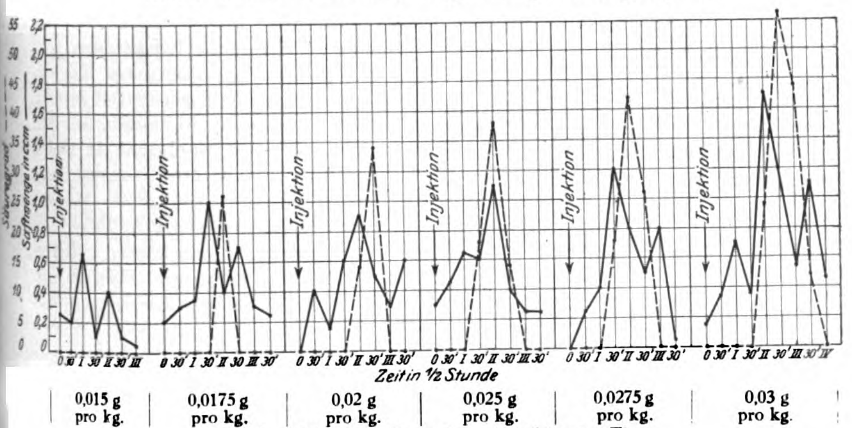


Abb. 1. 4. Hund. Ca-Versuche bei gleichzeitiger Wassergabe per os.



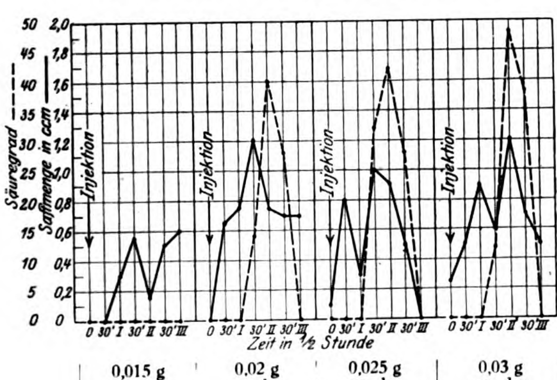
Fleisch allein. | Fleisch + Ca 0,025 g pro kg. | Fleisch + Ca 0,05 g pro kg. | Fleisch + Ca 0,075 g pro kg. | Fleisch + Ca nach 1 Stunde 0,1 g pro kg.

Abb. 2. 4. Hund. Ca-Versuche bei gleichzeitiger Fleischgabe per os.



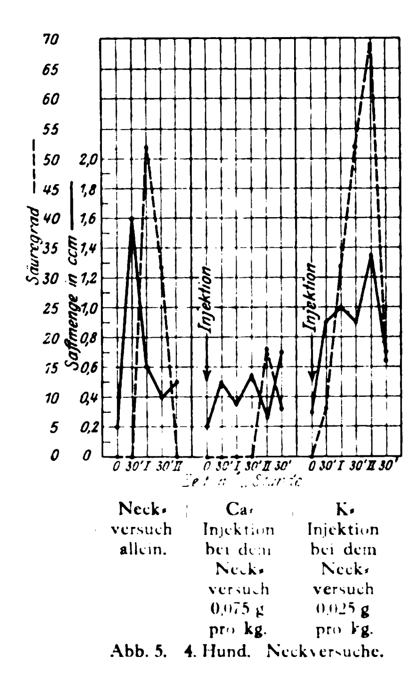
0,015 g pro kg. | 0,0175 g pro kg. | 0,02 g pro kg. | 0,025 g pro kg. | 0,0275 g pro kg. | 0,03 g pro kg.

Abb. 3. 4. Hund. K-Versuche bei nüchternem Tiere.



0,015 g pro kg. | 0,02 g pro kg. | 0,025 g pro kg. | 0,03 g pro kg.

Abb. 4. 4. Hund. Mg-Versuche bei nüchternem Tiere.



Neck-versuch allein. | Ca-Injektion bei dem Neck-versuch 0,075 g pro kg. | K-Injektion bei dem Neck-versuch 0,025 g pro kg.

Abb. 5. 4. Hund. Neckversuche.

Experimenteller Teil.

Die Versuche habe ich an vier Hunden von 9 bis 17 kg Körpergewicht gemacht, denen ein *Pawlow*scher Magenblindsack angelegt worden war. Die Tiere bekamen pro Kilogramm Körpergewicht 0,015 bis 0,1 g $CaCl_2$ in Wasser gelöst intravenös injiziert; bei den Kaliumversuchen waren die Dosen 0,01 bis 0,03 g KCl in Wasser gelöst. Die Injektionen wurden teils bei nüchternen Tieren, teils bei den Tieren gleichzeitig oder 1 bis 2 Stunden nach einer Fütterung mit Fleisch oder aber gleichzeitig mit einer Wassergabe gemacht. Die Magnesiumversuche mit 0,015 bis 0,03 g $MgCl_2$ pro Kilogramm wurden bei nüchternen Tieren gemacht.

Die Konzentration der injizierten Lösungen war 2 bis 5 proz.; nur bei den Versuchen mit Injektionen von 0,1 g $CaCl_2$ pro Kilogramm Körpergewicht war die Konzentration 10proz.

Alle Versuche habe ich an den Hunden gemacht, nachdem sie 18 bis 20 Stunden nüchtern gehalten worden waren. Vor jedem Versuch habe ich ferner 60 bis 90 Minuten lang den Absonderungsvorgang am Magenblindsack beobachtet. Bei Hunden, die überhaupt eine starke Sekretion zeigten, konnte ich öfters unter diesen Versuchsbedingungen keinen völligen Stillstand der Sekretion sehen. Ferner habe ich bei jedem Versuch die abfließende Magensaftmenge von 10 zu 10 Minuten gemessen und die Reaktion mit Lackmus und Kongopapier geprüft.

Die Schleimbeimischung zum Magensaft ist in der Tabelle schätzungsweise danach angegeben, ob die gequollene Schleimflocke ½, ¼ usw. der ganzen Magensaftmenge ausmachte. Ist nichts angegeben, so war der Saft makroskopisch schleimfrei. Die Aciditätsangaben bezeichnen die Zahl der zur Neutralisation verwandten Kubikzentimeter n/10 Natronlauge bei Dimethylamidoazobenzol als Indikator, berechnet auf 100 ccm Magensaft. In den Kurven also geben die Säurekurven nur die freie Salzsäure an. Die Fermentzahlen geben die Fermenteinheiten in 1 ccm Magensaft nach der Edestinmethode von *Fuld* an.

1. Hund.

Männlich. Körpergewicht 9,8 kg. Operation am 4. Juni 1924. Der Hund starb am 24. Tage nach der Operation im Anschluß an eine Chlorkaliuminjektion von 0,035 g KCl pro Kilogramm.

$CaCl_2$-Versuche 1 bis 4 zwischen dem 16. und 23. Tage nach der Operation.

KCl-Versuche 5 bis 7 zwischen dem 18. und 21. Tage nach der Operation.

Versuch 1.

Wasserversuch (16 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,4		sauer	+		13		0,8	1/3	sauer	+	
2	1,8	0,65	1/2	"	+	44	14	1,8	0,8		"	+	82
3		0,75	1/3	"	+		15		0,2		"	+	
4		0,8	dünnschleimig	"	+		16		0,4		"	+	
5	1,7	0,4		"	+	44	17	1,4	0,7		"	+	44
6		0,5		"	+		18		0,3		"	+	
Aqua dest. per os durch Sonde.							19		0,55	1/2	"	+	
7		1,6	1/4	sauer	+		20	1,25	0,45		"	+	40
8	6,1	2,5	1/2	"	+	116	21		0,25		"	+	
9		2,0		"	+		22		0,3		"	+	
10		1,5		"	+		23	0,95	0,15		"	+	34
11	3,6	0,9		"	+	92	24		0,5	1/2	"	+	
12		1,2		"	+								

Versuch 2.

Wasser-Chlorcalciumversuch (17 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,65	dünnschl.	sauer	+		13		0,5		sauer	+	
2	1,95	0,7	1/3	"	+	80	14	1,6	0,4		"	+	47
3		0,6		"	+		15		0,7	1/2	"	+	
4		0,7	1/2	"	+		16		0,5		"	+	
5	2,1	0,8		"	+	80	17	1,5	0,4		"	+	47
6		0,6		"	+		18		0,6		"	+	
0,075 g Chlorcalcium pro kg Körpergew. intraven., 200 ccm Aqua dest. durch Sonde.							19		0,4		"	+	
7		0,65		sauer	+		20	1,45	0,55	1/2	"	+	52
8	1,05	0,20		"	+	90	21		0,5		"	+	
9		0,2		"	+		22		0,6		"	+	
10		0,4	1/2	"	+		23	1,2	0,35	dünnschleimig	"	+	50
11	1,2	0,3		"	+	64	24		0,25		"	+	
12		0,5		"	+								

Versuch 3.

Fleischversuch (22 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,5	1/2	sauer	+		16		1,3		sauer	+	
2	1,6	0,3	dünnschl.	"	+	45	17	6,35	2,45		"	+	116
3		0,8	1/4	"	+		18		2,6		"	+	
4		0,7	1/	"	+		19		1,9		"	+	
5	1,7	0,35	dünnschl.	"	+	45	20	4,95	1,85		"	+	104
6		0,65		"	+		21		1,2		"	+	
200 g Fleisch per os.							22		1,15		"	+	
7		0,85		sauer	+		23	3,5	1,50		"	+	92
8	3,55	1,5		"	+	76	24		0,85		"	+	
9		1,2		"	+		25		0,8		"	+	
10		1,15		"	+		26	2,9	0,8		"	+	82
11	5,6	3,15		"	+	102	27		1,3		"	+	
12		1,30		"	+		28		0,65		"	+	
13		3,05		"	+		29	2,0	0,7		"	+	60
14	7,3	2,30		"	+	124	30		0,65	schleimig	"	+	
15		1,95		"	+								

Versuch 4.

Fleisch-Chlorcalciumversuch (23 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,50	1/2 dünnschleimig	sauer	+		16		0,5		sauer	+	
2	1,45	0,35		"	+	36	17	2,8	1,5	1/4	"	+	100
3		0,60		"	+		18		0,8		"	+	
4		0,45		"	+		19		0,6		"	+	
5	1,4	0,50		"	+	36	20	1,4	0,2		"	+	94
6		0,45	1/2	"	+		21		0,6		"	+	
0,1 g Chlorcalcium pro kg Körpergew. intravenös., 200 g Fleisch per os. (Nach $1^1/_2$ Minuten Brechbewegung ohne Erbrechen.)							22		0,9		"	+	
							23	2,0	0,6		"	+	86
7		0,30	dünnschl.	sauer	+		24		0,5		"	+	
8	0,95	0,20		"	+	34	25		0,7		"	+	
9		0,35		"	+		26	1,6	0,2		"	+	72
10		0,2		"	+		27		0,7		"	+	
11	1,3	0,4		"	+	65	28		0,60		"	+	
12		0,7		"	+		29	1,15	0,40	1/2 dünnschleimig	"	+	58
13		1,0		"	+		30		0,15		"	+	
14	3,2	1,2	1/3	"	+	83							
15		1,0		"	+								

Versuch 5.

Chlorkaliumversuch bei nüchternem Tiere (18 Tage nach der Operation).

1		0,25	schleimig	sauer	+		13		0,7		sauer	+	
2	1,4	0,60	1/3	"	+	42	14	2,20	0,8	1/2	"	+	73
3		0,55		"	+		15		0,7		"	+	
4		0,35	1/2	"	+		16		0,6		"	+	
5	1,4	0,65	1/3	"	+	44	17	2,4	1,2	schleimig	"	+	72
6		0,40		"	+		18		0,6		"	+	
0,015 g Chlorkalium pro kg Körpergew. intraven.													
7		0,30		sauer	+		19		0,55		"	+	
8	2,1	1,05	schleimig	"	+	46	20	1,75	0,90		"	+	58
9		0,75	1/2	"	+		21		0,30		"	+	
10		0,65		"	+		22		0,65		"	+	
11	1,55	0,50		"	+	60	23	2,25	0,85	schleimig	"	+	46
12		0,40		"	+		24		0,75	"	"	+	

Versuch 6.

Chlorkaliumversuch bei nüchternem Tiere (19 Tage nach der Operation).

1		0,50		sauer	+		13		1,1		sauer	+	
2	1,15	0,25		"	+	20	14	2,2	0,8		"	+	52
3		0,40		"	+		15		0,3		"	+	
4		0,40		"	+		16		0,5		"	+	
5	1,05	0,50	schleimig	"	+	20	17	1,8	0,8	1/4	"	+	44
6		0,15		"	+		18		0,5		"	+	
0,02 g Chlorkalium pro kg Körpergew. intraven.													
7		0,50		sauer	+		19		0,6		"	+	
8	1,45	0,55		"	+	28	20	1,6	0,5		"	+	38
9		0,40		"	+		21		0,5		"	+	
10		0,4		"	+		22		0,45		"	+	
11	1,9	0,7		"	+	39	23	1,35	0,50	schleimig	"	+	34
12		0,8		"	+		24		0,40		"	+	

Versuch 7.

Chlorkaliumversuch bei nüchternem Tiere (21 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,40		sauer	+		13		0,85		sauer	+	
2	0,95	0,30		"	+	12	14	2,25	0,90		"	+	44
3		0,25		"	+		15		0,50		"	+	
4		0,35	1/2	"	+		16		0,80		"	+	
5	0,85	0,25		"	+	12	17	1,9	0,65		"	+	40
6		0,25		"	+		18		0,45		"	+	
0,03 g Chlorkalium pro kg Körpergew. intravenös.							19		0,4		"	+	
7		0,35		sauer	+		20	3,2	0,6		"	+	26
8	1,15	0,45	1/2	"	+	22	21		2,2	2/3	"	+	
9		0,35		"	+		22		0,30		"	+	
10		0,35		"	+		23	1,5	0,65		"	+	23
11	1,5	0,45		"	+	22	24		0,55		"	+	
12		0,70		"	+								

2. Hund.

Männlich. Körpergewicht 10,1 kg. Operation am 2. August 1924. Der Hund starb am 30. Tage nach der Operation im Anschluß an eine Chlorkaliuminjektion von 0,0325 g KCl pro Kilogramm.

$CaCl_2$-Versuch 8 bis 12 zwischen dem 13. und 23. Tage nach der Operation.

KCl-Versuche 13 bis 15 zwischen dem 14. und 24. Tage nach der Operation.

Versuch 8.

Wasserversuch (13 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,15	schleimig	sauer	—		13		0,30		sauer	+	
2	0,5	0,15	"	"	—	—	14	1,05	0,25		"	+	28
3		0,20	"	"	—		15		0,50	schleimig	"	+	
200 ccm Aqua dest. per os durch Sonde.							16		0,3		"	+	
4		0,9	dünnschl.	sauer	±		17	0,9	0,5	dünnschl.	"	±	16
5	3,4	1,3		"	+	49	18		0,1	"	"	±	
6		1,2		"	+		19		0,2	"	"	—	
7		2,25	1/5	"	+		20	0,9	0,6	schleimig	"	—	—
8	4,0	1,10		"	+	84	21		0,1	"	"	—	
9		0,65		"	+								
10		0,45		"	+								
11	1,6	0,85	1/3	"	+	60							
12		0,30		"	+								

Versuch 9. Wasser-Chlorcalciumversuch (15 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,25	dünnschl.	sauer	+	
2	0,7	0,15	„	„	+	20
3		0,30	„	„	+	
4		0,20	„	„	+	
5	0,6	0,15	„	„	+	20
6		0,25	„	„	+	
0,05 g Chlorcalcium pro kg Körpergewicht intravenös, 200 ccm Aqua dest. durch Sonde.						
7		0,05	dünnschl.	sauer	±	
8	0,1	—				—
9		0,05	schleimig	„	—	
10		—				
11	0,05	0,05	„	„	—	—
12		—				

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
13		—				
14	0,25	0,05	schleimig	sauer	—	
15		0,20	dünnschl.	„	±	—
16		0,15		„	+	
17	0,5	0,20		„	+	36
18		0,15		„	+	
19						
20		0,25		„	+	
21	0,75	0,30		„	+	40
22		0,20		„	+	
23		0,20		„	+	
24	0,65	0,20		„	+	38
		0,25	½	„	+	

Versuch 10. Fleischversuch (18 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,30	½	sauer	+	
2	0,75	0,20	dünnschl.	„	+	14
3		0,25		„	+	
200 g Fleisch per os.						
4		0,8	½	sauer	+	
5	3,5	1,2		„	+	73
6		1,5		„	+	
7		1,5		„	+	
8	4,4	1,2		„	+	108
9		1,7	¼	„	+	
10		2,0		„	+	
11	5,4	2,0		„	+	126
12		1,4		„	+	
13		3,3		„	+	
14	8,1	2,4		„	+	138
15		2,4		„	+	

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
16		2,2	⅛	sauer	+	
17	5,9	2,1	1/7	„	+	124
18		1,6		„	+	
19		1,3		„	+	
20	3,6	1,0		„	+	115
21		1,3		„	+	
22		1,0		„	+	
23	3,0	1,2		„	+	100
24		0,8		„	+	
25		0,6		„	+	
26	2,5	1,1	⅕	„	+	82
27		0,8	½	„	+	

Versuch 11. Fleisch-Chlorcalciumversuch (21 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,25	schleimig	sauer	+	20
2	0,75	0,30		„	+	
3		0,20		„	+	
0,05 g Chlorcalcium pro kg Körpergewicht intravenös, 200 g Fleisch per os.						
4	—					—
5	—				—	
6	—					
7	—					
8	—					—
9	—					
10		0,2	schleimig	sauer		—
11	0,6	0,2	„	„	—	
12		0,2	„	„		

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
13		0,1	schleimig	sauer	—	—
14	0,8	0,2	„	„	—	
15		0,5	„	„	—	
16		0,60		„	±	
17	1,75	0,50		„	+	46
18		0,65		„	+	
19		0,30			+	
20	2,0	0,95		„	+	88
21		0,75			+	
22		0,70			+	
23	2,40	0,50		„	+	110
24		1,20			+	
25		0,80			+	
26	1,7	0,40		„	+	114
27		0,50			+	

Versuch 12. Fleisch-Chlorcalciumversuch (23 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,25		sauer	+	
2	0,7	0,25		„	+	22
3		0,2		„	+	
200 g Fleisch per os.						
4		0,9	1/3	sauer	+	
5	3,2	1,0	1/4	„	+	67
6		1,3		„	+	
7		1,6		„	+	
8	4,8	1,35	1/6	„	+	102
9		1,85		„	+	
0,075 g Chlorcalcium pro kg Körpergew. intraven.						
10		1,0		sauer	+	
11	1,3	0,25		„	+	100
12		0,05		„	+	
13		0,25		„	+	
14	1,0	0,2		„	+	58
15		0,55		„	+	
16		0,5		sauer	+	
17	1,6	0,55		„	+	37
18		0,55		„	+	
19		0,6		„	+	
20	1,7	0,6		„	+	67
21		0,5		„	+	
22		0,7		„	+	
23	1,25	0,3		„	+	88
24		0,25		„	+	
25		0,35		„	+	
26	1,0	0,4		„	+	65
27		0,25		„	+	
28		0,35		„	+	
29	0,85	0,25		„	+	58
30		0,25	schleimig	„	+	

Versuch 13. Chlorkaliumversuch (14 Tage nach der Operation).

1		0,2		sauer	+	
2	0,6	0,3	schleimig	„	+	18
3		0,1		„	+	
0,02 g Chlorkalium pro kg Körpergew. intraven.						
4		0,3		sauer	+	
5	1,0	0,4	dünnschl.	„	+	26
6		0,3	„	„	+	
7		0,35		„	+	
8	1,3	0,35	dünnschl.	„	+	30
9		0,60	1/2	„	+	
10		0,65	dünnschl.	„	+	
11	1,85	0,50	„	„	+	24
12		0,7	1/3	„	+	
13		0,7	dünnschl.	sauer	+	
14	1,50	0,5	„	„	+	32
15		0,3		„	+	
16		0,9	1/3	„	+	
17	1,7	0,45		„	+	40
18		0,35		„	+	
19		0,3		„	+	
20	1,1	0,55	dünnschl.	„	+	38
21		0,25	„	„	+	
22		0,2	schleimig	„	+	
23	0,8	0,3	„	„	+	30
24		0,3	„	„	+	

Versuch 14. Wasser-Chlorcalciumversuch (22 Tage nach der Operation).

1		0,1	schleimig	schwach sauer	—	
2	0,35	0,1	„		—	—
3		0,15	„		—	
200 ccm Aqua dest, per os durch Sonde.						
4		0,8	dünnschl.	sauer	±	
5	3,1	0,95		„	+	39
6		1,35		„	+	
7		3,0		„	+	
8	1,9	1,2		„	+	78
9		0,7		„	+	
10		0,8		„	+	
11	1,65	0,55		„	+	62
12		0,3		„	+	
13		0,3		„	+	
14	0,85	0,3		„	+	36
15		0,25		„	+	
0,025 g Chlorkalium pro kg Körpergew. intravenös.						
16		0,7	dünnschl.	sauer	+	
17	3,05	0,75		„	+	40
18		1,60	1/3	„	+	
19		0,9	1/3	„	+	
20	2,3	0,7	dünnschl.	„	+	39
21		0,7		„	+	
22		0,75	1/3	„	+	
23	1,8	0,8	1/3	„	+	54
24		0,25		„	+	
25		0,5	1/3	„	+	
26	1,6	0,4		„	+	40
27		0,7	1/3	„	+	
28		0,35	1/3	„	+	
29	0,7	0,1	schleimig	„	+	30
30		0,25		„	+	

Versuch 15.

Chlorkaliumversuch (24 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,15		sauer	+		13		0,8	1/4		+	
2	0,45	0,2	1/2	„	+	16	14	2,2	0,85	dünnschl.	sauer	+	28
3		0,1		„	+		15		0,55			+	
0,03 g Chlorkalium pro kg Körpergew. intraven.													
4		0,3			+		16		0,6			+	
5	1,3	0,2		sauer	+	20	17	1,9	0,5		„	+	52
6		0,8	1/2	„	+		18		0,8	1/4		+	
7		0,5			+		19		0,25			+	
8	1,15	0,3		„	+	29	20	1,0	0,45		„	+	32
9		0,35		„	+		21		0,30			+	
10		0,2			+		22		0,3	1/3		+	
11	1,8	0,3		„	+	18	23	0,9	0,3	schleimig	„	+	26
12		1,30	schleimig		+		24		0,3			+	

8. Hund.

Weiblich. Körpergewicht 15 kg. Operation am 16. September 1924. Der Hund starb am 40. Tage nach der Operation an einer Pneumonie.

$CaCl_2$-Versuche 16 bis 23 zwischen dem 13. und 32. Tage nach der Operation.

KCl-Versuche 24 bis 27 zwischen dem 19. und 27. Tage nach der Operation.

Versuch 16.

Wasserversuch (durchschnittliche Zahlen aus zwei Versuchen).
(13. und 15. Tag nach der Operation.)

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,4	schleimig		—		13		0,5			+	
2	1,15	0,4	„	schwach sauer	—	—	14	1,2	0,25			+	46
3		0,35	„		—		15		0,45			+	
200 ccm Aqua dest. per os durch Sonde.													
4		1,05			+		16		0,35			+	
5	7,35	4,2			+	84	17	1,4	0,85		schwach sauer	+	24
6		2,1			+		18		0,2			+	
7		1,8			+		19		0,25			+	
8	3,5	1,0		schwach sauer	+	109	20	0,8	0,35			+	8
9		0,7			+		21		0,2			+	
10		0,6			+								
11	1,45	0,5			+	78							
12		0,35			+								

Versuch 17.

Wasser-Chlorcalciumversuch (14 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,3	1/3	sauer	+		10		0,2		sauer	+	
2	1,0	0,4		„	+	27	11	0,4	0,1		„	+	35
3		0,3	1/2	„	+		12		0,1		„	+	
0,05 g Chlorcalcium pro kg Körpergew. intraven.,							13		0,1		„	+	
200 ccm Aqua dest. per os durch Sonde.							14	1,3	0,4		„	+	18
4		0,3		sauer	+		15		0,8	1/2	„	+	
5	2,1	0,5		„	+	48	16		0,2		„	+	
6		1,3	1/5	„	+		17	1,0	0,6	1/2	„	+	18
7		0,7		„	+		18		0,2		„	+	
8	1,6	0,5		„	+	66	19		0,3	2/3	„	+	
9		0,4		„	+		20	1,2	0,5		„	+	14
							21		0,4		„	+	

Versuch 18.

Wasser-Chlorcalciumversuch (16 Tage nach der Operation).

1		0,4	schleimig	schwach sauer			10		0,4		sauer	+	
2	1,2	0,3	„		—	—	11	1,0	0,3		„	+	35
3		0,5	„				12		0,3		„	+	
0,075 g Chlorcalcium pro kg Körpergew. intraven.,							13		0,2		„	+	
200 ccm Aqua dest. per os durch Sonde.							14	1,0	0,3	getrübt	„	+	12
4		0,0					15		0,5		„	+	
5	1,1	0,3	dünnschl.	sauer	±	10	16		0,3		„	±	
6		0,8		„	+		17	1,8	0,7	2/3	„	—	—
7		0,2		„	+		18		0,8	2/3	„	—	
8	0,95	0,2		„	+	40	19		0,1	schleimig	„	—	
9		0,35		„	+		20	0,6	0,3	„	„	—	—
							21		0,2	„	alkal.	—	

Versuch 19.

Fleischversuch (durchschnittliche Zahl aus drei Versuchen).
(17., 24. und 26. Tag nach der Operation.)

1		0,15	schleimig	sauer	—		13		2,7		sauer	+	
2	0,75	0,5	„	„	—	—	14	8,6	3,1		„	+	146
3		0,1	„	„	—		15		2,8		„	+	
200 g Fleisch per os.							16		2,8		„	+	
4		0,85	1/3	sauer	+		17	6,6	1,8		„	+	134
5	7,35	3,0		„	+	99	18		2,0		„	+	
6		3,50		„	+		19		2,3		„	+	
7		3,0		„	+		20	5,2	1,7		„	+	116
8	9,5	3,5		„	+	133	21		1,2		„	+	
9		3,0		„	+		22		1,4		„	+	
10		3,9		„	+		23	2,9	0,6		„	+	93
11	10,9	3,3		„	+	150	24		0,9		„	+	
12		3,7		„	+		25		1,0		„	+	
							26	1,8	0,5		„	+	76
							27		0,3		„	+	

Versuch 20. Fleisch-Chlorcalciumversuch (18 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,3	schleimig	amphoter	—		13		3,2	1/2	sauer	+	
2	1,1	0,3	„		—		14	8,3	3,2		„	+	136
3		0,5	„		—		15		1,9		„	+	
0,035 g Chlorcalcium pro kg Körpergew. intraven., 200 g Fleisch per os.							16		3,1		„	+	
							17	7,1	2,1		„	+	126
4		1,0	1/3	sauer	±		18		1,9		„	+	
5	2,7	0,6		„	+	45	19		2,1		„	+	
6		1,1		„	+		20	4,4	1,1		„	+	120
							21		1,2		„	+	
7		1,9		„	+		22		1,9		„	+	
8	6,8	2,6		„	+	104	23	3,8	1,2		„	+	116
9		2,3		„	+		24		0,7		„	+	
10		2,3		„	+		25		0,3		„	+	
11	8,8	2,0		„	+	126	26	1,0	0,3		„	+	100
12		4,5	1/2	„	+		27		0,4		„	+	

Versuch 21. Fleisch-Chlorcalciumversuch (21 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,4	schleimig	amphoter	—		13		2,1		sauer	+	
2	0,9	0,3	„		—	—	14	6,0	1,4		„	+	110
3		0,2	„		—		15		2,5		„	+	
0,05 g Chlorcalcium pro kg Körpergew. intraven., 200 g Fleisch per os.							16		2,2		„	+	
							17	6,7	2,5		„	+	120
4		0,3	dünnschl.	schw. sauer	—		18		2,0		„	+	
5	0,8	0,2	„		—	—	19		1,2		„	+	
6		0,3	„	sauer	—		20	2,9	1,0		„	+	135
							21		0,7		„	+	
7		0,5		„	±		22		0,3		„	+	
8	3,0	0,7		„	+	38	23	0,8	0,3		„	+	90
9		1,8		„	+		24		0,2		„	+	
10		1,7		„	+		25		0,4		„	+	
11	6,5	2,5		„	+	96	26	1,2	0,6		„	+	68
12		2,3		„	+		27		0,2		„	+	

Versuch 22. Fleisch-Chlorcalciumversuch (29 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1		0,4	dünnschl.	sauer	+		13		1,7		sauer	+	
2	1,0	0,4	„	„	+	20	14	5,4	1,8		„	+	107
3		0,2	„	„	+		15		1,9		„	+	
0,075 g Chlorcalcium pro kg Körpergew. intraven., 200 g Fleisch per os.							16		1,4		„	+	
							17	4,0	1,2		„	+	112
4		0,8	1/2	sauer	+		18		1,4		„	+	
5	1,7	0,6		„	+	15	19		1,2	1/4	„	+	
6		0,3		„	+		20	3,9	0,8		„	+	108
							21		1,9		„	+	
7		0,4			+		22		0,7		„	+	
8	3,0	1,2	1/3	„	+	40	23	2,0	0,9		„	+	100
9		1,4	1/3	„	+		24		0,4		„	+	
10		1,5		„	+		25		0,4	1/2	„	+	
11	4,0	1,1		„	+	90	26	1,15	0,25		„	—	80
12		1,4		„	+		27		0,35	1/3	„	+	

Versuch 23.

Fleisch-Chlorcalciumversuch (32 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1	0,3	1/3	sauer	+		13	1,3		sauer	+	
2	0,8 { 0,2	schleimig	"	+	18	14	4,2 { 1,6	1/4	"	+	94
3	0,3		"	+		15	1,3		"	+	
0,1 g Chlorcalcium pro kg Körpergewicht intravenös, 200 g Fleisch per os (nach 1 Minute Brechbewegung ohne Erbrechen).						16	1,4	1/4	"	+	
						17	3,1 { 1,0		"	+	104
						18	0,7		"	+	
4	0,2		sauer	+		19	1,2	1/3	"	+	
5	0,5 { 0,0		"	+	10	20	2,8 { 0,7		"	+	110
6	0,3	1/2	"	+		21	0,9		"	+	
7	0,3	1/3	"	+		22	0,5	1/3	"	+	
8	1,9 { 0,8		"	+	28	23	1,7 { 0,9		"	+	97
9	0,8	1/2	"	+		24	0,3		"	+	
10	1,0		"	+		25	0,3		"	+	
11	2,8 { 0,7		"	+	60	26	0,9 { 0,5	1/2	"	+	58
12	1,1		"	+		27	0,1	schleimig	"	+	

Versuch 24.

Chlorkaliumversuch (19 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1	0,4	1/2	sauer	+		13	0,6	schleimig	sauer	+	
2	0,8 { 0,2		"	+	40	14	1,5 { 0,5	"	"	+	45
3	0,2		"	+		15	0,4		"	+	
0,01 g Chlorkalium pro kg Körpergewicht intravenös.											
4	0,2		sauer	+		16	0,6	1/3	"	+	
5	0,7 { 0,2		"	+	40	17	1,2 { 0,2		"	+	40
6	0,3	dünnschl.	"	+		18	0,4		"	+	
7	0,2	"	"	+		19	0,5	1/2	"	+	
8	0,7 { 0,2		"	+	30	20	1,9 { 0,6		"	+	42
9	0,3	1/2	"	+		21	0,8	1/4	"	+	
10	0,6	1/2	"	+		22	0,4		"	+	
11	1,4 { 0,5	dünnschl.	"	+	22	23	0,9 { 0,2		"	+	38
12	0,3	"	"	+		24	0,3		"	+	

Versuch 25.

Chlorkaliumversuch (20 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1	0,3	schleimig	schwach sauer	—		13	0,7	dünnschl.	sauer	—	
2	0,9 { 0,2	"		—	—	14	1,9 { 0,5	"	"	±	8
3	0,4	"		—		15	0,7	1/4	"	+	
0,015 g Chlorkalium pro kg Körpergewicht intravenös.											
4	0,2	schleimig	schw. sauer	—		16	0,2		"	+	
5	1,6 { 0,6	"		—	—	17	0,9 { 0,4		"	+	22
6	0,8	"	schwach alkalisch	—		18	0,3		"	+	
7	0,3	"		—		19	0,4		"	+	
8	1,1 { 0,4	"		—	—	20	1,9 { 0,2	schleimig	"	+	10
9	0,4	"		—		21	1,3	dünnschl.	"	+	
10	0,8	"		—		22	0,05	schleimig	"	+	
11	1,5 { 0,5	"	schw. sauer	—	—	23	1,0 { 0,45		"	+	10
12	0,2	"	sauer	—		24	0,50	1/3	"	±	

Versuch 26.

Chlorkaliumversuch (25 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)
1	0,2	schleimig	schw. sauer	—		13	0,25		sauer	+	
2	0,5 { 0,1	„		—	—	14	1,1 { 0,40	schleimig	„	+	24
3	0,2	„		—		15	0,45		„	+	
0,02 g Chlorkalium pro kg Körpergewicht intravenös.						16	0,35	„	„	+	
4	0,6	schleimig	sauer	—		17	0,95 { 0,25	„	„	+	16
5	1,0 { 0,2	„	„	—	—	18	0,35	„	„	+	
6	0,2		„	—		19	0,35		„	+	
7	0,3		„	±		20	0,95 { 0,20		„	+	18
8	1,3 { 0,2		„	+	10	21	0,40		„	+	
9	0,8	„	„	+		22	0,10		„	+	
10	1,00	„	„	+		23	0,85 { 0,10		„	+	20
11	1,5 { 0,25		„	+	20	24	0,65	1/2	„	+	
12	0,25		„	+							

Versuch 27.

Chlorkaliumversuch (27 Tage nach der Operation).

1	0,20	1/2	sauer	+		13	0,7	1/3	sauer	+	
2	0,75 { 0,15	schleimig	„	+	12	14	1,6 { 0,4		„	+	49
3	0,40		„	+		15	0,5		„	+	
0,025 g Chlorkalium pro kg Körpergewicht intravenös						16	0,4		„	+	
4	0,6	1/2	sauer	+		17	1,3 { 0,3		„	+	44
5	1,6 { 0,5		„	+	35	18	0,6	1/2	„	+	
6	0,5		„	+		19	0,2		„	+	
7	0,5	1/2	„	+		20	1,0 { 0,2	1/2	„	+	40
8	1,5 { 0,3		„	+	34	21	0,6	1/3	„	+	
9	0,7	1/3	„	+		22	0,5	1/2	„	+	
10	0,4	1/4	„	+		23	1,2 { 0,4		„	+	48
11	2,3 { 1,8	1/4	„	+	30	24	0,3		„	+	
12	1,1	1/3	„	+							

4. Hund.

Männlich. Körpergewicht 17 kg. Operation am 16. November 1924. Der Hund lebte noch bei Abschluß der Arbeit.

$CaCl_2$-Versuche 28 bis 37 zwischen dem 13. und 29. Tage nach der Operation (s. Abb. 1 bis 4).

KCl-Versuche 38 bis 43 zwischen dem 78. und 87. Tage nach der Operation (s. Abb. 1 bis 4).

$MgCl_2$-Versuche 44 bis 47 zwischen dem 72. und 76. Tage nach der Operation.

Versuch 28.

Wasserversuch (durchschnittliche Zahlen aus zwei Versuchen).
(18. und 21. Tag nach der Operation.)

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1		0,0	Schleimhaut	amphoter			
2		0,0					
3		0,0					
250 ccm Aqua dest. per os durch Sonde.							
4		0,3		sauer	±		
5	2,1	1,0		„	+	70	64—128
6		0,8		„	+		
7		0,8		„	+		
8	1,3	0,2		„	+	94	64—128
9		0,3		„	+		
10		0,2		„	+		
11	0,7	0,2		„	+	84	128—256
12		0,3		„	+		
13		0,5		„	+		
14	1,0	0,2		„	+	45	128—256
15		0,3		„	+		
16		0,3		„	+		
17	0,8	0,4		„	±	22	128—256
18		0,1		„	+		

Versuch 29.

Wasser-Chlorcalciumversuch (19 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1		0,0	Schleimhaut	amphoter			
2		0,0					
3		0,0					
0,015 g Chlorcalcium pro kg Körpergewicht intravenös, 250 ccm Aqua dest. per os durch Sonde.							
4		0,6	1/2	schwach sauer	—		
5	1,4	0,4	1/3	sauer	±	28	128
6		0,4		„	+		
7		0,3		„	+		
8	0,9	0,4		„	+	88	128
9		0,2		„	+		
10		0,7	1/1	„	+		
11	1,0	0,2	1/2	„	+	56	256
12		0,1		„	+		
13		0,0					
14	1,0	1,0	dünnschleimig	„	+	34	256
15		0,0					
16		0,3		„	+		
17	0,3	0,0				40	128
18		0,0					

Versuch 30.

Wasser-Chlorcalciumversuch (20 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1		0,0	Schleim-				
2		0,0		amphoter			
3		0,0	haut				

0,025 g Chlorcalcium pro kg Körpergewicht intravenös, 250 ccm Aqua dest. per os durch Sonde.

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
4		0,0					
5	1,0	0,1		sauer	±	72	64
6		0,9	1/2	„	+		
7		1,0		„	+		
8	1,7	0,3		„	+	86	128
9		0,4		„	+		
10		0,1		„	+		
11	0,8	0,0		„	+	76	128
12		0,7	1/2	„	+		
13		0,0					
14	0,4	0,3		„	+	20	128
15		0,1	schleimig	„	±		
16		0,0					
17	0,1	0,1	„	„	—	—	—
18		0,0					

Versuch 31.

Wasser-Chlorcalciumversuch (22 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1		0,0					
2		0,0	Schleim-	schwach sauer			
3		0,0	haut				

0,0375 g Chlorcalcium pro kg Körpergewicht intravenös, 250 ccm Aqua destillata per os durch Sonde.

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
4		0,0					
5		0,0	Schleim-	amphoter			
6		0,0	haut	schwach sauer			
7		0,8	schleimig	sauer	±		
8	1,9	0,7		„	+	60	64
9		0,4		„	+		
10		0,3		„	+		
11	0,5	0,1		„	+	84	64
12		0,1		„	+		
13		0,1		„	+		
14	0,8	0,6	1/3	„	+	80	128
15		0,1		„	+		
16		0,1		„	+		
17	0,4	0,0		„	+	30	128
18		0,3	2/3	„	+		

Versuch 32. **Wasser-Chlorcalciumversuch (23 Tage nach der Operation).**

Zeit in 15-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1		0,0	Schleimhaut	amphoter			
2		0,0					
3		0,0					

0,05 g Chlorcalcium pro kg Körpergewicht intravenös, 250 ccm Aqua dest. per os durch Sonde.

Zeit in 15-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
4		0,0					
5	0,2	0,0	Schleimhaut	amphoter			
6		0,2	dünnschl.	"	—	—	64
7		0,2		sauer	±		
8	0,6	0,3		"	+	76	64
9		0,1		"	+		
10		0,1		"	+		
11	0,3	0,1		"	+	60	64
12		0,1		"	+		
13		0,0					
14	0,3	0,0					
15		0,3	dünnschl.	"	+	20	128
16		0,30	schleimig	"	—		
17	0,55	0,25	"	"	—	—	128
18		0,00					

Versuch 33. **Fleischversuch (durchschnittliche Zahlen aus zwei Versuchen). (13. und 16. Tag nach der Operation.)**

Zeit in 15-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1		0,0	Schleimhaut	schwach sauer			
2		0,0					
3		0,0					

200 g Fleisch per os.

Zeit in 15-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
4		0,35		sauer	+		
5	2,85	1,00		"	+	78	128
6		1,50		"	+		
7		1,5		"	+		
8	4,3	1,3		"	+	112	32—128
9		1,5		"	+		
10		1,5		"	+		
11	4,8	1,8		"	+	123	32
12		1,5		"	+		
13		1,3		"	+		
14	3,9	1,2		"	+	126	32
15		1,4		"	+		
16		0,95		"	+		
17	2,55	0,80		"	+	114	32
18		0,80		"	+		
19		0,8		"	+		
20	2,3	0,7		"	+	88	32
21		0,8		"	+		
22		0,55		"	+		
23	1,05	0,30		"	+	62	32
24		0,20		"	+		

Versuch 34. Chlorcalcium-Fleischversuch (14 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1		0,0					
2		0,0					
3		0,0	Schleimhaut	schw. sauer			

0,025 g Chlorcalcium pro kg Körpergew. intravenös, 200 g Fleisch per os.

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
4		0,0					
5	2,4	0,9	dünnschl.	sauer	±	58	128
6		1,5		„	+		
7		1,2		„	+		
8	3,0	1,1		„	+	94	64
9		0,7	1/3	„	+		
10		1,2	1/4	„	+		
11	3,2	1,1		„	+	108	64
12		0,9		„	+		
13		1,3		„	+		
14	2,3	0,6		„	+	102	32
15		0,4		„	+		
16		0,2		„	+		
17	1,8	0,9		„	+	106	32
18		0,7		„	+		
19		0,9		„	+		
20	1,6	0,2		„	+	112	32
21		0,5		„	+		
22		0,5		„	+		
23	0,9	0,3		„	+	96	32
24		0,1		„	+		

Versuch 35. Fleisch-Chlorcalciumversuch (15 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1		0,0	Schleimhaut	amphoter			
2		0,0					
3		0,0					

0,05 g Chlorcalcium pro kg Körpergewicht intravenös, 200 g Fleisch per os.

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
4		0,0					
5	0,5	0,0					
6		0,5	schleimig	schwach sauer	—	—	128
7		0,1		sauer	±		
8	1,0	0,4		„	+	52	128
9		0,5		„	+		
10		0,6	1/3	„	+		
11	1,3	0,4		„	+	68	64
12		0,3		„	+		
13		0,4		„	+		
14	1,4	0,6		„	+	82	32
15		0,4	1/2	„	+		
16		0,1		„	+		
17	0,4	0,1		„	+	106	32
18		0,2	1/2	„	+		
19		0,3	1/2	„	+		
20	0,7	0,2		„	+	110	32
21		0,2		„	+		
22		0,2		„	+		
23	0,5	0,3	1/3	„	+	90	32
24		0,0					

Versuch 36.

Fleisch-Chlorcalciumversuch (17 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1	0,0					
2	0,0	Schleim-	amphoter			
3	0,0	haut				

0,075 g Chlorcalcium pro kg Körpergewicht intravenös, 200 g Fleisch per os.

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
4	0,0					
5	0,0	Schleim-	amphoter			
6	0,0	haut				
7	0,0					
8	0,6 { 0,5	schleimig	schwach alkal.	—	—	128
9	0,1		sauer	—		
10	0,1		"	+		
11	0,5 { 0,1		"	+	64	128
12	0,3		"	+		
13	0,3		"	+		
14	1,3 { 0,5	1/2	"	+	84	64
15	0,5	1/3	"	+		
16	0,2	1/2	"	+		
17	0,5 { 0,2		"	+	100	32
18	0,1		"	+		
19	0,1		"	+		
20	0,3 { 0,1		"	+	96	32
21	0,1		"	+		
22	0,1		"	+		
23	0,4 { 0,2		"	+	82	32
24	0,1		"	+		

Versuch 37.

Fleisch-Chlorcalciumversuch (29 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1	0,0					
2	0,0	Schleim-	schwach	—	—	—
3	0,0	haut	sauer			

200 g Fleisch per os.

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
4	0,4		sauer	+		
5	3,0 { 0,8		"	+	75	128
6	1,8		"	+		
7	1,4		"	+		
8	5,0 { 1,5		"	+	104	128
9	2,1		"	+		

0,1 g Chlorcalcium pro kg Körpergewicht intravenös (nach 2 Minuten zwei kleine Fleischmassen erbrechen).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
10	0,5		sauer	+		
11	0,8 { 0,1		"	+	108	32
12	0,2		"	+		

Versuch 37 (Fortsetzung).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
13		0,2		sauer	+		
14	1,2	0,3		„	+	94	32
15		0,7		„	+		
16		0,6		„	+		
17	2,1	0,8		„	+	90	32
18		0,7		„	+		
19		0,6		„	+		
20	1,8	0,4		„	+	90	32
21		0,8	1/2	„	+		
22		0,6		„	+		
23	1,2	0,2		„	+	88	32
24		0,4		„	+		
25		0,7		„	+		
26	2,3	0,5		„	+	74	32
27		1,1	3/4	„	+		
28		0,5	1/3	„	+		
29	1,1	0,3		„	+	70	32
30		0,3		„	+		
31		0,2		„	+		
32	0,9	0,2		„	+	60	64
33		0,5		„	+		

Versuch 38.

Chlorkaliumversuch (78 Tage nach der Operation).

1		0,1	schleimig	amphoter	—		
2	0,25	0,05	„	„	—		16
3		0,1	„	„	—		
0,015 g KCl pro kg Körpergewicht intravenös.							
4		0,05	schleimig		—		
5	0,2	0,1	„	amphoter	—		128
6		0,05	„	schwach alkal.	—		
7		0,05	„	„	—		
8	0,65	0,5	„	„	—		64
9		0,1	„	„	—		
10		0,0					
11	0,1	0,0					128
12		0,1	„	schw. sauer	—		
13		0,1	„	sauer	—		
14	0,4	0,25	„	„	—		128
15		0,05	„	„	—		
16		0,0					
17	0,1	0,1	„	„	—		
18		0,0					
19		0,0					
20	0,05	0,0					
21		0,05	„	„	—		
22		0,0					
23		0,0					
24		0,0					

Versuch 39.

Chlorkaliumversuch (79 Tage nach der Operation).

Zeit in 15-Minuten-perioden	Magensaft-menge ccm		Schleim-beimengung	Lackmus-reaktion	Kongorot-reaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungs-kraft (Pepsin-einheit)
1		0,1	schleimig	schw. sauer	—		
2	0,2	0,1	„		—	—	8
3		0,0	„				
	0,0175 g KCl pro kg Körpergewicht intravenös.						
4		0,2	schleimig	schw. sauer	—		
5	0,3	0,0	„	„	—	—	32
6		0,1	„	„	—		
7		0,0	„	„	—		
8	0,35	0,20	„	„	—	—	128
9		0,15	„	sauer	—		
10		0,35	„	„	—		
11	1,0	0,65	dünn-	„	—	—	128
12		0,0	schleimig	„			
13		0,05	schleimig-	„	±		
14	0,4	0,20	flüssig	„	+	26	256
15		0,15			+		
16		0.0		„	—		
17	0,7	0,05	schleimig	„	—	—	256
18		0,65	„	„	—		
19		0,0					
20	0,3	0,3	„	„	—	—	256
21		0,0					
22		0,25	„				
23	0,25	0,0			—	—	164
24		0.0					

Versuch 40.

Chlorkaliumversuch (81 Tage nach der Operation).

1		0,0					
2		0,0	Schleim-	alkalisch			
3		0.0	haut				
	0,02 g Chlorkalium pro kg Körpergewicht intravenös.						
4		0,0					
5	0,4	0,4	schleimig	schwach	—	—	—
6		0,0		alkalisch			
7		0,15	dünn-	„			
8	0,15	0,0	flüssig		—	—	—
9		0,0					
10		0,2	„	„	—		
11	0,6	0,0				—	16
12		0,4	„	schw. sauer	—		
13		0,4	„	sauer	±		
14	0,9	0,2		„	+	14	64
15		0.3	1/3	„	+		

Versuch 40 (Fortsetzung).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
16	0,15		sauer	+		
17	0,5 {0,25		„	+	34	128
18	0,10		„	+		
19	0,1		„	—		
20	0,3 {0,0				—	256
21	0,2	schleimig	„	—		
22	0,6	„	„	—		
23	0,6 {0,0				—	32
24	0,0					

Versuch 41.

Chlorkaliumversuch (82 Tage nach der Operation).

1	0,2		schwach	—		
2	0,3 {0,0		sauer		—	64
3	0,1		„	—		
	0,025 g Chlorkalium intravenös.					
4	0,10	schleimig	schw. sauer	—		
5	0,45 {0,15	„	„	—	—	64
6	0,20		„	—		
7	0,10	„	„	—		
8	0,65 {0,30	1/3	„	—	—	128
9	0,25		„	—		
10	0,10		„	±		
11	0,6 {0,25	1/2	„	+	18	128
12	0,25		„	+		
13	0,4	1/2	„	+		
14	1,1 {0,2		„	+	38	256
15	0,5	1/4	„	+		
16	0,1		„	+		
17	0,4 {0,2	1/2	„	+	14	256
18	0,1	schleimig	„	±		
19	0,10	„	„	—		
20	0,25 {0,05	„	„	—	—	128
21	0,10	„	„	—		
22	0,0		„	—		
23	0,25 {0,15	„	„	—	—	32
24	0,10	„	„	—		

Versuch 42.

Chlorkaliumversuch (85 Tage nach der Operation).

1	0,0	Schleim-	schwach			
2	0,0	haut	alkalisch			
3	0,0					
	0,0275 g Chlorkalium pro kg Körpergewicht intravenös.					
4	0,0		schwach			
5	0,25 {0,25	schleimig	alkalisch	—	—	—
6	0,0					

Versuch 42 (Fortsetzung).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
7	0,0					
8	0,4 { 0,1	schleimig	±	—	—	32
9	0,3	dünnschleim.	sauer	—		
10	0,55		"	+		
11	1,2 { 0,30		"	+	18	128
12	0,35		"	+		
13	0,3		"	+		
14	0,8 { 0,2		"	+	42	256
15	0,3		"	+		
16	0,15		"	+		
17	0,5 { 0,20	"	"	+	26	128
18	0,15		"	+		
19	0,0					
20	0,8 { 0,0					
21	0,8	schleimig	"	—	—	128
22	0,0					
23	0,05 { 0,0					
24	0,05	"	"	—	—	

Versuch 43.

Chlorkaliumversuch (87 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1	0,0					
2	0,15 { 0,15	schleimig	amphoter	—	—	—
3	0,0					
	0,03 g Chlorkalium pro kg Körpergewicht intravenös.					
4	0,05	dünnschleim.	schw. sauer	—		
5	0,35 { 0,10	"	"	—	—	32
6	0,20	"	"	—		
7	0,15	schleimig	"	—		
8	0,7 { 0,25	"	sauer	—	—	64
9	0,30	"	"	—		
10	0,05	"	"	—		
11	0,35 { 0,10	"	"	—	—	128
12	0,20	"	"	—		
13	0,8	1/3	"	±		
14	1,7 { 0,4		"	+	24	256
15	0,5		"	+		
16	0,35		"	+		
17	1,15 { 0,50		"	+	56	256
18	0,30		"	+		
19	0,30		"	+		
20	0,55 { 0,15		"	+	44	256
21	0,1		"	+		
22	0,2	1/2	"	+		
23	1,1 { 0,3	1/2	"	+	12	128
24	0,6	dünnschleim.	"	±		
25	0,30	"	"			
26	0,45 { 0,15	"	"	—	—	128
27	0,0					

Versuch 44.

Chlormagnesiumversuch (72 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1		0,0	Schleimhaut				
2		0,0		schw. sauer			
3		0,0					
0,015 g Chlormagnesium pro kg Körpergewicht intravenös.							
4		0,0	Schleimhaut				
5		0,0		schw. sauer			
6		0,0					
7		0,25	schleimig	"	—	—	64
8	0,3	0,05	"	"	—		
9		0,00					
10		0,50	"	"	—		
11	0,55	0,0					
12		0,05	"	"	—	—	64
13		0,00					
14	0,15	0,05	"	"	—		
15		0,10	"	sauer	—	—	64
16		0,05	"	"	—		
17	0,5	0,20	"	"	—		
18		0,25	"	"	—	—	128
19		0,45	"	"	—		
20	0,6	0,15	"	"	—	—	64
21		0,00					

Versuch 45.

Chlormagnesiumversuch (74 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1		0,0	Schleimhaut	amphoter			
2		0,0					
3		0,0					
0,02 g Chlormagnesium pro kg Körpergewicht intravenös.							
4		0,20	dünnschleim.	schw. sauer	—		
5	0,65	0,20	"	"	—	—	64
6		0,25	"	sauer	—		
7		0,15	"	"	—		
8	0,75	0,20	"	"	—	—	128
9		0,40	"	"	—		
10		0,5	schleimig	"	—		
11	1,2	0,1		"	±	14	256
12		0,6	1/4	"	+		
13		0,35		"	+		
14	0,75	0,20		"	+	40	256
15		0,20		"	+		
16		0,4	1/3	"	+		
17	0,7	0,2		"	+	28	256
18		0,1		"	+		
19		0,7	schleimig	"	—	—	128
20	0,7	0,0					
21		0,0					

Versuch 46.

Chlormagnesiumversuch (75 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1		0,0					
2	0,1	0,0					
3		0,1	schleimig	amphoter	—	—	
0,025 g Chlormagnesium pro kg Körpergewicht intravenös.							
4		0,3	schleimig	schw. sauer	—		
5	0,8	0,3	"		—	—	128
6		0,2	"		—		
7		0,05	dünnschl.	sauer	—		
8	0,3	0,1	"	"	—	—	256
9		0,15	"	"	—		
10		0,25	"	"	±		
11	1,0	0,5	2/3	"	+	32	256
12		0,25	1/2	"	+		
13		0,2		"	+		
14	0,9	0,5		"	+	42	256
15		0,2		"	+		
16		0,3		"	+		
17	0,5	0,1		"	+	28	256
18		0,1	schleimig	"	±		
19		0,0					
20	0,0	0,0					
21		0,0					

Versuch 47.

Chlormagnesiumversuch (76 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1		0,10	dünnschl.	schwach	—	—	
2	0,25	0,15	"	sauer			16
3		0,0					
0,03 g Chlormagnesium pro kg Körpergewicht intravenös.							
4		0,25	dünnschl.	schwach sauer	—		
5	0,5	0,15	"	"	—	—	128
6		0,10	"	"	—		
7		0,45	"	"	—		
8	0,9	0,20	"	sauer	—	—	128
9		0,25	"	"			
10		0,15	"	"	—		
11	0,6	0,25		"	±	12	256
12		0,20		"	+		
13		0,6		"	+		
14	1,2	0,4		"	+	48	256
15		0,2		"	+		
16		0,25		"	+		
17	0,7	0,20		"	+	38	256
18		0,25	1/2	"	±		
19		0,10	schleimig	"	—		
20	0,5	0,25	"	"	—	—	64
21		0,15	"	"	—		

4. Hund.

Versuche über die Beeinflussung der durch Necken mit vorgehaltenem Fleisch hervorgerufenen Magensekretion bei gleichzeitiger intravenöser $CaCl_2$- und KCl-Injektion.

Kontrollversuch 48 am 91. Tage nach der Operation.
$CaCl_2$-Versuch 49 am 93. Tage nach der Operation.
KCl-Versuch 50 am 94. Tage nach der Operation.
Kontrollversuch 51 am 77. Tage nach der Operation.

Versuch 48.

Neckversuch (91 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm		Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1		0,0					
2	0,2	0,2	schleimig	amphoter			16
3		0,0		„			
Necken durch vorgehaltenes Fleisch bis zum Ende des Versuchs.							
4		0,4	schleimig	schwach alkal.		—	128
5	1,6	0,6	dünnschl.	„			
6		0,6		sauer	—		
7		0,3		„	+		
8	0,6	0,2		„	+	52	128
9		0,1		„	+		
10		0,2		„	+		
11	0,4	0,1		„	+	32	256
12		0,1		„	schwach +		
13		0,0					
14	0,5	0,1	dünnschl.	„	—	—	256
15		0,4	schleimig	„	—		

Versuch 49.

Neckversuch mit Chlorcalciuminjektion (93 Tage nach der Operation).

1		0,0					
2	0,2	0,15	schleimig	schwach sauer	—	—	64
3		0,05	„	„	—		

0,075 g Chlorcalcium pro kg Körpergewicht intravenös.
Necken durch vorgehaltenes Fleisch bis zum Ende des Versuchs.

4		0,0					
5	0,5	0,4	schleimig	sauer	—	—	64
6		0,1	„	„	—		
7		0,10	„	±	—		
8	0,35	0,20	„	±	—	—	128
9		0,05	„	±	—		
10		0,15	dünnschl.	sauer	—		
11	0,55	0,15	„	„	—	—	128
12		0,25	„	„	—		
13		0,10		„			
14	0,25	0,05		„	+	18	256
15		0,10	„	„	+		
16		0,2	„	„	+		
17	0,7	0,4	„	„	±	8	256
18		0,1	„	„	—		

Versuch 50.

Neckversuch mit Chlorcalciuminjektion (94 Tage nach der Operation).

Zeit in 10-Minuten-Perioden	Magensaftmenge ccm	Schleimbeimengung	Lackmusreaktion	Kongorotreaktion	Säuregrad (freie ClH)	Verdauungskraft (Pepsineinheit)
1	0,0					
2	0,3 {0,0					
3	0,3	schleimig	schwach alkal.	—	—	—
0,025 g Chlorkalium pro kg Körpergewicht intravenös und Necken durch vorgehaltenes Fleisch bis zum Ende des Versuchs.						
4	0,2	dünnschl.	±	—		
5	0,9 {0,4	flüssig getrübt	sauer	±	8	128
6	0,3		"	+		
7	0,20		"	+		
8	1,0 {0,55		"	+	32	256
9	0,25		"	+		
10	0,30	1/3	"	+		
11	0,9 {0,25		"	+	52	256
12	0,35	1/3	"	+		
13	0,25		"	+		
14	1,35 {0,90	1/3	"	+	69	256
15	0,20		"	+		
16	0,2		"	+		
17	0,7 {0,3	dünnschl.	"	±	16	256
18	0,2	"	"	±		

Versuch 51.

Beobachtung des nüchternen Tieres ohne Injektionen (77 Tage nach der Operation).

1	0,0					
2	0,0			—		
3	0,05	schleimig	amphoter			
4	0,0					
5	0,0			—		
6	0,2	"	"			
7	0,0					
8	0,15	"	"	—		
9	0,0					
10	0,0					
11	0,0			—		
12	0,2	"	schw. alkal.			
13	0,0					
14	0,1	dünnschl.	amphoter	—		
15	0,1	"	"			
16	0,0					
17	0,2	"	schwach sauer	—		
18	0,05	"	"			
19	0,0	Schleimhaut	"			
20	0,0			—		
21	0,0					
22	0,2	schleimig	"			
23	0,0			—		
24	0,05	"	"			

Derartige Kontrollversuche, wie dieser Versuch 51, habe ich öfters gemacht, um sicher zu sein, daß die Sekretionsänderungen nach den Injektionen bei nüchternem Tiere auch wirklich ein Folge dieser Injektionen waren.

Literatur.

1) *F. Kraus*, *S. G. Zondek*, *Arnoldi* und *Wallheim*, Die Stellung der Elektrolyte im Organismus. Klin. Wochenschr., 3. Jahrg., Nr. 17, 1924. – 2) *Zondek*, Deutsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 50,; diese Zeitschr. 132, 362, 1922; *Krauss* und *Zondek*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 36. — 3) *Blühdorn*, Über Kaliumtherapie. Klin. Wochenschr. 3. Jahrg., 1924, Nr. 29. – 4) *A. Bickel*, Die dynamische Wirkung der Ionen auf Stoffwechsel und Wachstum der lebendigen Substanz. Deutsch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 40 u. 43. — 5) *Wilenko*, Über den Einfluß intravenöser Injektionen von konzentrierten Salzlösungen auf die Magensaftsekretion. Internat. Beitr. z. Path. u. Therap. d. Ernährungsstörungen 2. Berlin, Verlag Hirschwald. – 6) *A. Bickel*, Der nervöse Mechanismus der Sekretion der Magendrüsen und der Muskelbewegung am Magendarmkanal. Festschrift für Prof. *Asher*: Ergebnisse der Physiologie von *Asher* und *Spiro* 1925; ferner Klin. Wochenschr. 1925, Nr. 4.

Über die diuretische Wirkung von Chlorophyll.

Von

T. Gordonoff und T. Amakawa.

(Aus dem pharmakologischen Institut der Universität Bern.)

(Eingegangen am 20. Februar 1925.)

Bürgi[1]) und seine Schüler haben durch eine größere Anzahl von Versuchen zeigen können, daß das Chlorophyll eine belebende Wirkung auf eine ganze Reihe von isolierten Organen ausübt. So belebt es das Herz [*Yoshiike*[2]), *Miadera*[3]), *Gordonoff* und *Kajikawa*[4]) u. a.], den Darm [*Gordonoff* und *Hanehira*[5])] und den Uterus [*Gordonoff* und *Inowashiro*[6])]. Außerdem hat *Königsfeld*[7]) eine den allgemeinen Stickstoffumsatz steigernde Wirkung des Chlorophylls gefunden. Man kann aus diesen Versuchen mit einem gewissen Rechte schließen, daß alle Organe des Körpers durch kleine Chlorophyllmengen angeregt werden, dies um so mehr, als durch verschiedene Arbeiten *Bürgis* und seiner Schüler auch eine den allgemeinen Stoffwechsel vermehrende Eigenschaft wahrscheinlich gemacht worden ist.

Um die Reihe dieser Untersuchungen zu vervollständigen, untersuchten wir den Einfluß des Chlorophylls auf die Diurese. Wir experimentierten ausschließlich an männlichen Kaninchen mit der Katheterisiermethode. Die Tiere erhielten jeweilen 24 Stunden vor dem Versuch weder Wasser noch Nahrung. Als Chlorophyll verwendeten wir eine 1proz. Chlorophyllin-Natriumlösung.

---

[1]) Korrespondenzbl. f. Schweiz. Ärzte 1916, Nr. 5; Therap. Monatsh. Nr. 1 und 2, 1918.

[2]) Unveröffentlicht.

[3]) Berl. klin. Wochenschr. 1921. S. 1159.

[4]), [5]) und [6]) werden demnächst veröffentlicht.

[7]) Zeitschr. f. exper. Med. 26, 216.

Wir lassen die Angaben über unsere Versuche gleich folgen:

a) Das Chlorophyllin-Natrium wurde dem Versuchstier intravenös appliziert.

Versuch 1. Kaninchen von 1950 g Gewicht.

$9^{a}\,55'$	Entleerung der Blase.
10 55	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 3 ccm.
10 55	Intravenöse Injektion von 1 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht.
11 55	Urinmenge von 1 Stunde 3,0 ccm.
$1^{p}\,55$	„ „ 2 Stunden 4,5 „
3 55	„ „ 2 „ 4,0 „
5 55	„ „ 2 „ 2,5 „

Versuch 2. Kaninchen von 1800 g Gewicht.

$10^{a}\,00'$	Entleerung der Blase.
11 00	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 6 ccm.
11 00	Intravenöse Injektion von 1 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht.
12 00	Urinmenge von 1 Stunde 1,5 ccm.
$2^{p}\,00$	„ „ 2 Stunden 16 „
4 00	„ „ 2 „ 0,5 „
6 00	„ „ 2 „ 1,0 „

Versuch 3. Kaninchen von 1850 g Gewicht.

$9^{a}\,30'$	Entleerung der Blase.
10 30	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 1 ccm.
10 30	Injektion von 2 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht.
11 30	Urinmenge von 1 Stunde 1,5 ccm.
$1^{p}\,30$	„ „ 2 Stunden 4,0 „
3 30	„ „ 2 „ 1,5 „
5 30	„ „ 2 „ 0,8 „

Versuch 4. Kaninchen von 2000 g Gewicht.

$8^{a}\,40'$	Entleerung der Blase.
9 40	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 1,8 ccm.
9 40	Injektion von 4 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht.
10 40	Urinmenge von 1 Stunde 2,8 ccm grün gefärbt.
11 40	„ „ 1 „ 3,5 „ „ „
$1^{p}\,40$	„ „ 2 Stunden 6,0 „ „ „
3 40	„ „ 2 „ 2,0 „ „ „
5 40	„ „ 2 „ 2,0 „ „ „

Versuch 5. Kaninchen von 1800 g Gewicht.

$8^{a}\,45'$	Entleerung der Blase.
9 45	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 1,8 ccm.
9 45	Injektion von 5 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht.
10 45	Urinmenge von 1 Stunde 2,0 ccm grün gefärbt.
11 45	„ „ 1 „ 1,0 „ „ „
$1^{p}\,45$	„ „ 2 Stunden 4,0 „ „ „
3 45	„ „ 2 „ 3,5 „ „ „
5 45	„ „ 2 „ 2,0 „

Versuch 6. Kaninchen von 1900 g Gewicht.

$8^{a}30'$	Entleerung der Blase.				
9 30	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 2,5 ccm.				
9 30	Injektion von 10 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht. Nach der Injektion war das Tier ganz normal. 10 Minuten nach der Injektion stellten sich heftige Krämpfe ein, welche den baldigen Exitus herbeiführten.				

Versuch 7. Kaninchen von 1900 g Gewicht.

$8^{a}30'$	Entleerung der Blase.				
9 30	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 1,5 ccm.				
9 30	Injektion von 7 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht.				
10 30	Urinmenge von	1 Stunde	2,0 ccm	bluthaltig.	
11 30	„ „	1 „	1,5 „	grün gefärbt.	
$1^{p}30$	„ „	2 Stunden	3,5 „	„ „	
3 30	„ „	2 „	5,0 „	normale Farbe.	
5 30	„ „	2 „	3,0 „		
7 30	„ „	2 „	2,0 „		

Versuch 8. Kaninchen von 1700 g Gewicht.

$8^{a}30'$	Entleerung der Blase.				
9 30	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 1 ccm.				
9 30	Injektion von 7 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht.				
10 30	Urinmenge von	1 Stunde	1,5 ccm	bluthaltig.	
11 30	„ „	1 „	1,0 „		
$1^{p}30$	„ „	2 Stunden	2,0 „	grün gefärbt.	
3 30	„ „	2 „	2,0 „	„ „	schwach.
5 30	„ „	2 „	8,0 „	„ „	„
7 30	„ „	2 „	3,0 „		

Versuch 9. Kaninchen von 1600 g Gewicht.

$8^{a}00'$	Entleerung der Blase.				
9 00	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 3 ccm.				
9 00	Injektion von 7 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht.				
10 00	Urinmenge von	1 Stunde	6,0 ccm	grün gefärbt.	
11 00	„ „	1 „	6,0 „	„ „	
12 00	„ „	1 „	3,0 „		
$2^{p}00$	„ „	2 Stunden	3,0 „		
4 00	„ „	2 „	0,5 „		

b) Versuche mit peroraler Applikation.

Versuch 10. Kaninchen von 1800 g Gewicht.

$8^{a}00'$	Entleerung der Blase.			
9 00	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 1 ccm.			
9 00	Das Tier erhält per Magensonde 10 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht.			
10 00	Urinmenge von	1 Stunde	3,0 ccm.	
11 00	„ „	1 „	5,0 „	
12 00	„ „	1 „	16,0 „	
$2^{p}00$	„ „	2 Stunden	1,5 „	
4 00	„ „	2 „	0,5 „	

Versuch 11. Kaninchen von 2000 g Gewicht.

8^{a} 15'	Entleerung der Blase.				
9 15	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 7 ccm.				
9 15	Das Tier erhält 15 ccm Chlorophyllin-Natrium per os pro Kilogramm Gewicht.				
10 15	Urinmenge	von	1	Stunde	13,0 ccm.
11 15	„	„	1	„	20,5 „
12 15	„	„	1	„	5,5 „
2^{p} 15	„	„	2	Stunden	16,0 „
4 15	„	„	2	„	4,0 „

Versuch 12. Kaninchen von 1800 g Gewicht.

7^{a} 15'	Entleerung der Blase.				
8 15	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 3,5 ccm.				
8 15	Das Tier erhält per os 5 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht.				
9 15	Urinmenge	von	1	Stunde	5,5 ccm.
10 15	„	„	1	„	13,0 „
11 15	„	„	1	„	11,5 „
12 15	„	„	1	„	9,0 „
2^{p} 15	„	„	2	Stunden	10,0 „
4 15	„	„	2	„	5,0 „

Versuch 13. Kaninchen von 2100 g Gewicht.

1^{p} 30'	Entleerung der Blase.				
2 30	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 3 ccm.				
2 30	Das Tier erhält 10 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht per os.				
3 30	Urinmenge	von	1	Stunde	2,0 ccm.
4 30	„	„	1	„	9,0 „
5 30	„	„	1	„	4,0 „
6 30	„	„	1	„	1,5 „

Versuch 14. Kaninchen von 1700 g Gewicht.

1^{p} 35'	Entleerung der Blase.				
2 35	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 5 ccm.				
2 35	Das Tier erhält 15 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht per os.				
3 35	Urinmenge	von	1	Stunde	6,0 ccm.
4 35	„	„	1	„	8,0 „
5 35	„	„	1	„	3,0 „
6 35	„	„	1	„	4,0 „

Versuch 15. Kaninchen von 2000 g Gewicht.

7^{a} 15'	Entleerung der Blase.				
8 15	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 7 ccm.				
8 15	Das Tier erhält 20 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht per os.				
9 15	Urinmenge	von	1	Stunde	8,0 ccm.
10 15	„	„	1	„	16,0 „
11 15	„	„	1	„	5,5 „
12 15	„	„	1	„	3,5 „
2^{p} 15	„	„	2	Stunden	2,5 „

Versuch 16. Kaninchen von 1700 g Gewicht.

7ª 15′	Entleerung der Blase.				
8 15	Normal-Urinmenge von 1 Stunde 0,5 ccm.				
8 15	Das Tier erhält 20 ccm Chlorophyllin-Natrium pro Kilogramm Gewicht per os.				
9 15	Urinmenge	von	1	Stunde	5,0 ccm.
10 15	„	„	1	„	6,0 „
11 15	„	„	1	„	9,0 „
12 15	„	„	1	„	2,0 „
2p 15	„	„	2	Stunden	4,0 „

Daß die Chlorophylline ähnlich oder gleich wirken wie unverändertes Chlorophyll, ist schon in einer so großen Anzahl von Versuchsreihen, die oben angegeben worden sind, festgestellt worden, daß wir dieses lösliche Präparat ruhig für unsere Versuche verwenden konnten. Es wäre auch gar nicht möglich gewesen, mit einem unveränderten Chlorophyll Diureseversuche vorzunehmen.

Die Versuche zerfallen in solche, bei denen intravenöse Injektionen der genannten Substanz gemacht worden sind, und in andere, bei denen wir das Mittel per os gaben.

10 ccm der 1 proz. Chlorophyllin-Natriumlösung wirkten, intravenös gegeben, tödlich. Bei Verwendung von 7 ccm intravenös war der Urin leicht bluthaltig, bei Mengen von 4 bis 5 ccm und mehr war er deutlich grün gefärbt, mit anderen Worten: das Chlorophyllin wurde in diesen Fällen in ausreichender Quantität durch den Urin ausgeschieden, so daß man es in demselben nachweisen konnte. In allen Versuchen mit intravenösen Injektionen trat eine Steigerung der Diurese ein.

Bei Versuch 1 kann man sich freilich fragen, ob die geringe Zunahme nicht einfach auf die Verabreichung von 1 ccm Flüssigkeit zurückzuführen sei.

In Versuch 2 stieg die normale Urinmenge von 6 auf 16 ccm, trotzdem auch nur 1 ccm eingespritzt worden war.

In Versuch 3 war das Resultat nicht sehr bedeutend, und die Deutung ist etwas schwer. Immerhin ist sowohl in diesem wie auch in dem nächsten Versuch eine leichte Steigerung der Diurese anzunehmen.

Das gleiche gilt für Versuch 5 bei Injektion von 5 ccm. Auch die Versuche, bei denen 7 ccm injiziert worden sind, zeigen im großen und ganzen eine Zunahme der Diurese, die nicht nur auf die gegebene Flüssigkeitsmenge *zurückzuführen* ist.

So wurden z. B. in Versuch 8 im Laufe von 10 Stunden 14,5 ccm mehr ausgeschieden, als der durchschnittlichen Urinmenge entsprochen hätte. Noch deutlicher waren die Wirkungen bei der Einfuhr von Chlorophyllin per os.

Z. B. stieg in Versuch 10 die normale Urinmenge, die pro Stunde 1 ccm betragen hatte, in der dritten Stunde auf 16 ccm, und in Versuch 11 von 7 auf 20,5 ccm.

Nur die Versuche 13 und 14 gaben ein verhältnismäßig geringes Resultat, wenn man die relativ große eingeführte Flüssigkeitsmenge beachtet. Wir gaben Dosen von 5 bis 20 ccm Chlorophyllin-Natrium und hatten den Eindruck, daß eine mittlere Dosis von 10 bis 15 ccm am besten wirkte.

Die Wirkungen sind nicht sehr bedeutend. Auch das stimmt mit den sonst beobachteten belebenden Eigenschaften des Chlorophylls überein, da es niemals große, wohl aber regelmäßige und gut nachweisbare Erregungen hervorruft.

Die Bedeutung des Calciums für die Gattung Citromyces.

Von

S. J. Kusnetzov.

(Aus dem Laboratorium für Pflanzenphysiologie der I. Moskauer Universität.)

(Eingegangen am 10. Februar 1925.)

I. Einleitung.

Die Physiologie der Citromycesarten interessierte die Forscher hauptsächlich im Zusammenhang mit der Frage nach der Bildung von Citronensäure. Doch ist der Mechanismus der Citronensäurebildung bis jetzt noch ungeklärt.

Dieser Umstand wurde seinerzeit von *A. P. Artari* und *E. E. Uspenski* damit erklärt, daß die Physiologie des Citromyces im allgemeinen noch wenig erforscht ist. Indessen würde eine eingehende Erforschung der Ernährungsphysiologie des Citromyces auch in praktischer Hinsicht von nicht geringem Interesse sein. Bekanntlich wird die Technik der Citronensäureherstellung nicht so sehr durch eine schlechte Ausbeute an Citronensäure behindert, als vielmehr durch die Schwierigkeit, sich vor Penicillium und ähnlichen Organismen zu schützen. Aus diesem Grunde wurden von *E. E. Uspenski* Versuche ausgeführt, welche bezweckten, eine zwar für Citromyces geeignete, jedoch für seine Konkurrenten unbrauchbare Nährlösung herzustellen. Unter anderem wurden sehr gute Resultate mit einigen Nährlösungen mit Calciumcarbonat und 0,3proz. KNO_3 als Stickstoffquelle erzielt. Ferner lag es nahe, $Ca(NO_3)_2$ anzuwenden, doch ging, wie die Versuche erwiesen hatten, in den Kulturen mit Calciumcarbonat und $Ca(NO_3)_2$ als Stickstoffquelle die Entwicklung des Pilzes langsamer vor sich, und die Ausbeute an Säure war nur unbedeutend.

Daher machte mir Prof. *E. E. Uspenski* den Vorschlag, die Frage näher zu untersuchen, ob die Anwesenheit des Ca-Ions, die Alkalität der Nährlösung oder irgend eine andere Versuchsbedingung eine schädliche Wirkung auf die Kulturen verursache.

II. Methodik der Versuche.

Für die meisten Kulturen wurden Winogradskykolben benutzt. In jedes Kolbenglas wurden je 100 ccm Nährlösung gegossen, so daß der Boden des Kolbenglases mit einer 0,7 bis 1,0 cm hohen Schicht der Lösung bedeckt war.

Die Nährlösung bestand aus einer ungefähr 10proz. Zuckerlösung, der 0,02proz. $MgSO_4$, 0,05proz. KH_2PO_4, Spuren von Fe_2Cl_6 und 0,05 Proz. N hinzugefügt wurden. Als Stickstoffquelle dienten KNO_3, $Ca(NO_3)_2$, NH_4NO_3, $(NH_4)_2SO_4$.

Wenn eine konstante Reaktion der Nährlösung erforderlich war, fügten wir der Kultur bis zu m/15 einer Lösung von Phosphaten (KH_2PO_4 und K_2HPO_4) als Puffer hinzu.

Vor der Aussat wurde der Pilz durch einen Bohnenabsud (nach *Mazé*) mit 6- bis 10 Proz. Zucker hindurchgeführt. In jedes Kolbenglas wurden dreimal mittels einer Platinöse Sporen ausgesät. Die Kulturen wurden im Thermostaten bei einer Temperatur von etwa 19 bis 22° C gehalten.

Bei der Analyse der Kulturen mit einem Zusatz von Calciumcarbonat wurde letzteres in schwacher Salzsäure gelöst, das Mycel wurde mit destilliertem Wasser ausgewaschen und auf ein Filter gebracht; das Filtrat brachten wir sodann auf ein bestimmtes Volumen. Zucker wurde nach *Bertrand* analysiert, die Citronensäure wurde in Form ihres Calciumsalzes durch Gewichtsanalyse bestimmt. Das Mycel wurde so lange bei 60° C getrocknet, bis sich sein Gewicht nicht mehr änderte, und danach gewogen.

Die Reaktion der Lösung wurde kolorimetrisch, der Stickstoff nach *Kjeldahl* bestimmt. Eine Reinkultur des Citromyces glaber erhielten wir von Prof. *W. Omeljanski.*

III. Die Grenze der Alkalität und die für die Entwicklung des Citromyces glaber optimale Reaktion der Nährlösung.

Bei den Versuchen zur Ermittlung der optimalen Reaktion für die Entwicklung des Citromyces glaber bestand die Nährlösung aus 10 proz. Zucker und den entsprechenden Salzen. Der Stickstoff war in Form von KNO_3 enthalten. Die Reaktion wurde alle 2 Tage geprüft. Während der ersten 4 Tage blieb sie fast unverändert, später begann sie jedoch saurer zu werden, so daß wir im voraus berechnete Mengen von KOH steril hinzufügen mußten, um die Reaktion konstant zu erhalten.

Der Entwicklungsgang des Mycels wird durch Tabelle I wiedergegeben.

Tabelle I.

	p_H	Zweiter Tag	Vierter Tag
a b	5,0	Mycel bildet an der Oberfläche keine zusammenhängende Schicht	Das ganze Mycel an der Oberfläche, bildet jedoch keine zusammenhängende Schicht. Conidien
a b	5,5	Mycel bedeckt die Oberfläche in zusammenhängender Schicht	Mycel bedeckt die ganze Oberfläche. Es entstehen Conidien
a b	6,1	Zusammenhängende Schicht fehlt	Mycel schwach entwickelt, befindet sich unter sowie an der Oberfläche. Conidien fehlen
a b	6,6	Dasselbe	Dasselbe
a b	7,0 7,1	Eine Entwicklung fast nicht zu merken, zusammenhängende Schicht fehlt	Dasselbe
a b	7,3 7,4	Entwicklung fast nicht zu merken	Mycel nur unter der Oberfläche
a	7,7	Dasselbe	Dasselbe
a b	7,9	Dasselbe	Dasselbe

Aus der Tabelle geht hervor, daß die optimale Reaktion für die Entwicklung des Citromyces glaber auf dem erwähnten Nährboden einem p_H von etwa 5,5 entspricht. Ferner ist zu erwarten, daß sich der Pilz bei einer nahezu neutralen und schwach alkalischen Reaktion nur unterhalb der Oberfläche der Flüssigkeit entwickelt.

Leider wurden die alkalischen Kulturen bei der Entnahme von Proben am neunten Tage mit Bakterien infiziert, daher führen wir das Gewicht des Mycels am Schluß des Versuchs nicht an. Der Versuch kann nur als ein vorläufiger betrachtet werden, doch ist das Bild bereits derart deutlich, daß im vorliegenden Falle eine Auswertung nur deshalb nicht erfolgen kann, weil eine objektive Wiedergabe nicht möglich ist.

Um den Grenzwert der für die Entwicklung des Citromyces glaber zulässigen Alkaliwerte genauer zu ermitteln, wurden Kulturen in Erlenmeyerkolben von 60 ccm Inhalt mit 35 ccm Nährlösung aufgestellt. Der Stickstoff war in Form von KNO_3 enthalten, als Kohlenstoffquelle diente Saccharose, die 2 Proz. invertierten Zucker enthielt.

Bei p_H etwa 8,7 trat zwar eine Keimung der Sporen ein, doch entwickelte sich das Mycel nicht. Bei p_H 9,0 fand überhaupt keine Entwicklung statt.

IV. Einfluß der Calciumionen auf die Entwicklung des Citromyces glaber und auf die Bildung von Citronensäure.

Wie bereits von *E. E. Uspenski* beobachtet wurde, ist in Kulturen mit Calciumcarbonat und $Ca(NO_3)_2$ als Stickstoffquelle die Entwicklung des Pilzes eine sehr geringe und die Ausbeute an Citronensäure ist unbedeutend im Vergleich mit den Kulturen, bei denen Ammoniumsalze und KNO_3 als Stickstoffquelle dienten. Dies geht aus Tabelle II mit großer Deutlichkeit hervor.

Tabelle II.

Als Zucker wurde Glucose benutzt.

		$Ca(NO_3)_2$ 0,1 Proz. N	$Ca(NO_3)_2$ 0,05 Proz. N	KNO_3 0,05 Proz. N	$(NH_4)_2SO_4$ 0,05 Proz. N	NH_4NO_3 0,1 Proz. N	NH_4NO_3 0,05 Proz. N	Dauer der Kultur
Ohne $CaCO_3$	Gewicht des Mycels a	2,97	2,07	2,18	2,35	2,36	1,86	48 Tage
	Gewicht des Mycels b	2,93	1,90	1,98	2,22	2,35	1,92	
	Mittel	2,95	1,99	2,01	2,29	2,35	1,89	
Mit $CaCO_3$	Gewicht des Mycels a	0,99	1,11	1,65	1,57	2,60	1,67	21 Tage
	Gewicht des Mycels b	0,99	1,15	1,95	1,47	2,85	1,94	
	Mittel	0,99	1,13	1,80	1,52	2,72	1,80	
	Mittlere Ausbeute an Citronensäure	2,4	2,3	23,8	25,0	16,9	21,3	
	Stickstoff des Mycels in mg	29,1	28,3	46,6	—	—	—	

Wie aus der Tabelle ersichtlich, wurden $(NH_4)_2SO_4$, NH_4NO_3, KNO_3 und $Ca(NO_3)_2$ in ihrer Eigenschaft als Stickstoffquellen unter-

sucht. Die beste Ausbeute an Citronensäure wurde in einer Nährlösung mit $(NH_4)_2SO_4$ als Stickstoffquelle, und zwar in Kulturen mit Calciumcarbonat erzielt.

Darauf folgen KNO_3, NH_4NO_3 mit 0,05 Proz. N, NH_4NO_3 mit 0,1 Proz. N und an letzter Stelle $Ca(NO_3)_2$. KNO_3 steht dem $(NH_4)_2SO_4$ hinsichtlich seines Nährwerts fast gar nicht nach. Bei Erhöhung der $(NH_4)NO_3$-Menge von 0,05 bis zu 0,1 Proz. N verringert sich die Ausbeute an Citronensäure von 21,3 bis auf 16,9 Proz.

Die Kulturen mit $Ca(NO_3)_2$ als Stickstoffquelle und mit Calciumcarbonat scheinen ihrem Aussehen nach zu hungern; die Ausbeute an Citronensäure beträgt nur 2,3 Proz.

Bei einer erhöhten Calciumnitratmenge entwickelt sich der Pilz in einer Calciumcarbonat enthaltenden Lösung schlechter, die Ausbeute an Citronensäure wird nicht gesteigert.

Wenden wir uns nunmehr den Kulturen ohne Calciumcarbonat, d. h. mit einer sauren Nährlösung, zu (die unmittelbare Prüfung der Reaktion ergibt, daß Citromyces glaber in Kulturen mit $Ca(NO_3)_2$ die Lösung bis zu $p_H = 2{,}6$ ansäuert), so erreicht das Mycel seine üppigste Entwicklung in einer Lösung mit erhöhter Beigabe von $Ca(NO_3)_2$. Wir können daraus den Schluß ziehen, daß das $Ca(NO_3)_2$ in einer sauren Lösung im Gegensatz zu den Kulturen mit Calciumcarbonat eine geeignete Stickstoffquelle bildet und das Ca-Ion keinen schädlichen Einfluß ausübt.

Gleichzeitig zeigt bereits dieser Versuch, daß die Wirkung von $Ca(NO_3)_2$ weder der physiologischen Alkalität, noch dem Mangel an Stickstoffnahrung zugeschrieben werden darf. Wenn die physiologische Alkalität von $Ca(NO_3)_2$ wirklich eine Rolle spielen würde, so müßte dieses ebenso deutlich auch bei KNO_3 in Erscheinung treten. Wäre ferner das $Ca(NO_3)_2$ lediglich eine schlechte Stickstoffquelle, so müßte die Vergrößerung seiner Menge um das Doppelte eine Besserung herbeiführen. Da dies aber nicht eintrat, vielmehr das Gegenteil beobachtet wurde, so ist es klar, daß die schlechte Assimilation des Stickstoffs in diesem Falle bereits eine sekundäre Erscheinung ist, die mit der allgemeinen Vergiftung im Zusammenhang steht.

Demnach kann eine giftige Wirkung des Ca-Ions angenommen werden, die sich jedoch nur in einer alkalischen oder schwach sauren Lösung zeigt.

Nachdem somit als wahrscheinlich festgestellt worden war, daß ein Überschuß an Calciumsalzen giftig sei, führte ich eine Serie von Versuchen aus, in denen mehr Mg zugesetzt wurde, um die Wirkung der Ca-Ionen abzuschwächen. Diese Reihe sollte überdies die Ergebnisse des vorhergehenden Versuchs in bezug auf die Stickstoffquellen bestätigen.

Tabelle III.

Als Zuckerquelle diente Glucose. Dauer der Kulturen 33 Tage. In sämtliche Kolbengläser wurden je 3 g Calciumcarbonat hinzugefügt.

	$Ca(NO_3)_2$; 0,1 Proz. N			$Ca(NO_3)_2$; 0,05 Proz. N			KNO_3; 0,05 Proz. N			$MgSO_4$; 0,02 Proz.		
	$MgSO_4$ 0,02 Proz.	$MgSO_4$ 0,08 Proz.	$MgSO_4$ 0,3 Proz.	$MgSO_4$ 0,02 Proz.	$MgSO_4$ 0,08 Proz.	$MgSO_4$ 0,3 Proz.	$MgSO_4$ 0,02 Proz.	$MgSO_4$ 0,08 Proz.	$MgSO_4$ 0,3 Proz.	$(NH_4)_2SO_4$ 0,05 Proz. N	NH_4NO_3 0,1 Proz. N	NH_4NO_3 0,05 Proz. N
Gewicht des Mycels a . .	1,16	1,09	1,85	1,83	1,60	2,11	1,92	2,08	2,01	1,39	2,66	1,77
Gewicht des Mycels b . .	1,60	1,46	2,10	1,29	1,30	1,84	2,04	2,19	2,26	1,65	2,90	1,78
Mittel . .	1,38	1,27	1,98	1,56	1,45	1,98	1,98	2,13	2,13	1,50	2,78	1,78
Citronensäure auf je 1 g Mycel a . .	0,20	0,19	0,14	0,19	0,27	0,22	1,20	1,34	1,32	1,49	0,72	1,28
Citronensäure auf je 1 g Mycel b . .	0,13	0,19	0,17	0,19	0,23	0,26	0,96	1,07	1,01	1,04	0,60	1,03
Mittel . .	0,16	0,19	0,16	0,19	0,25	0,24	1,08	1,21	1,17	1,27	0,66	1,16
Citronensäure in Proz. d. verbrauchten Zuckers a . .	3,2	3,1	3,7	4,8	6,5	5,7	28,3	31,7	30,2	33,3	20,3	31,0
Citronensäure in Proz. d. verbrauchten Zuckers b . .	3,1	4,1	5,2	4,3	4,7	6,4	22,3	27,4	25,8	28,6	18,4	26,0
Mittel . .	3,1	3,6	4,5	4,5	5,6	6,0	25,3	29,5	28,0	30,9	19,4	28,5

Aus Tabelle III ist zu ersehen, daß bei einer stärkeren Konzentration von $MgSO_4$ die schädliche Wirkung des Ca-Ions tatsächlich etwas abgeschwächt wird. Hinsichtlich der Stickstoffquellen finden die Resultate des vorhergehenden Versuchs ihre Bestätigung, wobei die günstige Wirkung von $MgSO_4$ auch in den Kulturen mit KNO_3 sich geltend zu machen scheint.

Die folgende Versuchsreihe bildet eine unmittelbare Fortsetzung der vorhergehenden. Hier wollten wir die in der Literatur vorhandenen Angaben hinsichtlich der Entwicklungshemmung des Mycels während der ersten Tage der Entwicklung in den Kulturen mit Calciumcarbonat prüfen; ferner sollte die optimale Konzentration von $MgSO_4$ in den Kulturen mit Calciumcarbonat und $Ca(NO_3)_2$ ermittelt, sowie festgestellt werden, welchen Einfluß die Art der Sterilisierung der Nährlösung auf die Ausbeute an Citronensäure ausübt.

Zur Neutralisation versuchten wir *Phosphorit*, $MgCO_3$ und Calciumcarbonat zu benutzen. Als Zuckerquelle diente Glucose. Temperatur des Versuchs 18 bis 20^0 C.

Wie aus der Tabelle IV zu ersehen, ist für die Ausbeute an Citronensäure in einer Lösung mit Calciumcarbonat und mit 0,05 Proz. N in Form von $Ca(NO_3)_2$ eine Konzentration von 0,3 Proz. $MgSO_4$ eine optimale.

Bei einer stärkeren Konzentration tritt zu der schädlichen Wirkung der Ca-Ionen auch eine solche der Mg-Ionen hinzu.

Wird den Kulturen mit $Ca(NO_3)_2$ zum Zwecke der Neutralisation statt $CaCO_3$ $MgCO_3$ zugesetzt, so steigt die Ausbeute an Citronensäure um etwa 3 Proz., wenn man auf den verbrauchten Zucker berechnet, und um 20 bis 30 Proz. gegenüber der Ausbeute an Citronensäure, die man mit $CaCO_3$ erhält.

Die Entwicklung des Pilzes geht während der ersten Tage infolge einer größeren Alkalität des $MgCO_3$ sehr langsam vor sich; so wurde die Entwicklung des Mycels erst eine Woche nach der Aussaat bemerkbar.

Die Neutralisation mit Phosphorit (gemahlenem Phosphorit aus den Juraablagerungen von Studjenyi Owrag bei Moskau) hatte ein negatives Resultat ergeben — es bildeten sich nur einige wenige Sphärokristalle von citronensaurem Calcium. Die Art der Sterilisation der Lösung ist, wie ein Vergleich der Tabellen III und IV zeigt, von großer Bedeutung.

Sterilisiert man die Nährlösung mit dem Calciumcarbonat zusammen (die Ammoniumsalze natürlich gesondert) im Autoklaven bei 120^0 im Verlauf von 20 Minuten, so bilden sich auf $Ca(NO_3)_2$, wie aus Tabelle II zu ersehen, 4,5 Proz. Citronensäure. Wenn aber das Calciumcarbonat trocken getrennt sterilisiert und vor der Aussat des Pilzes der Nährlösung steril zugefügt wird (die Nährlösung wurde ebenfalls

Tabelle IV.

	$Ca(NO_3)_2$ 0,05 Proz. N, $MgSO_4$ 0,02 Proz. ohne Calciumcarbonat		$Ca(NO_3)_2$ 0,05 Proz. N mit 5 g Calciumcarbonat auf jedes Kolbenglas					$Ca(NO_3)_2$ 0,05 Proz. N, $MgSO_4$ 0,02 Proz.	
			$MgSO_4$ 0,02 Proz.	$MgSO_4$ 0,02 Proz.	$MgSO_4$ 0,3 Proz.	$MgSO_4$ 0,6 Proz.	$MgSO_4$ 2,4 Proz.	$MgCO_3$ 4 g	Phosphorit 5 g
Gewicht des Mycels a . .	1,68	2,14	0,91	2,49	2,73	2,82		2,36	etwa 2 g
Gewicht des Mycels b . .	1,61	2,19	0,98	2,32	2,51	2,56		2,06	
Mittel . .	1,64	2,16	0,94	2,40	2,62	2,69		2,21	
Citronensäure auf 1 g Mycel a . .				0,44	0,44	0,40		0,54	Spuren
Citronensäure auf 1 g Mycel b . .				0,45	0,48	0,39		0,73	
Mittel . .				0,44	0,46	0,40		0,69	
Ausbeute an Citronensäure in Proz. des Zuckers a . .				11,1	12,3	11,5	11,1	12,9	Spuren
Ausbeute an Citronensäure in Proz. des Zuckers b . .				10,7	12,0	10,2	9,4	15,1	
Mittel . .				10,9	12,1	10,8	10,2	14,0	
Menge des Mycels auf 1 g Zucker a . .	0,33	0,25	0,27	0,25	0,28	0,29		0,24	etwa 0.25 g
Menge des Mycels auf 1 g Zucker b . .	0,34	0,22	0,29	0,24	0,25	0,26		0,21	
Mittel . .	0,34	0,23	0,28	0,25	0,26	0,27		0,22	
Dauer der Kulturen, Tage .	8	34	8	34	34	34	34	34	34

im Autoklaven sterilisiert), so beträgt die Ausbeute an Citronensäure 10,9 Proz. (Tabelle III). Dieses Ergebnis ist dadurch zu erklären, daß das Zusetzen des Calciumcarbonats nach der Sterilisation das p_H um 0,2 bis 0,3 verringert.

In derselben Versuchsserie gelang es uns, quantitativ die frühere Beobachtung zu bestätigen, daß die anfängliche Entwicklung des Pilzes in einer Calciumcarbonat enthaltenden Nährlösung stark verlangsamt wird, obgleich in der Folge das Gewicht des Mycels in den Kulturen mit Calciumcarbonat sogar größer ist als in den Kulturen ohne Calciumcarbonat. Dies steht in direkter Beziehung zu der durch $CaCO_3$ hervorgerufenen Alkalität; diese wird unwirksam, sobald der Pilz anfängt, Citronensäure zu bilden.

Was den ökonomischen Koeffizienten anbetrifft, so ist er anfangs in den Versuchen ohne Calciumcarbonat nicht sehr gering (etwa 0,34). Wenn alsdann die Lösung übermäßig sauer wird, geht er bis auf 0,23 herunter. Wird Calciumcarbonat zugesetzt, so zeigt sich die Verringerung des ökonomischen Koeffizienten mit dem Alter weniger deutlich, besonders bei größeren Beigaben von $MgSO_4$. Da hierdurch gleichzeitig eine Anhäufung von Citronensäure hervorgerufen wird, in der etwa ein Drittel der Zuckerenergie gebunden bleibt, so erweist sich der ökonomische Koeffizient der verbrauchten Energie in diesem Falle bedeutend höher.

Um die schädliche Wirkung der Calciumionen von einer derartigen der Alkalität endgültig zu trennen, nahmen wir eine Reihe von Kulturen vor, denen lösliche Calciumsalze zugesetzt wurden.

Die Nährlösung enthielt Saccharose und den gewöhnlichen Zusatz von $MgSO_4$ und KH_2PO_4. Die Stickstoffquelle bildeten 0,05 Proz. N $(NH_4)_2SO_4$. Außerdem wurden verschiedene Calciumsalze zugesetzt, um die Wirkung der Calciumionen von der Wirkung der Säureanionen zu sondern. Die Calciumsalze wurden derart zugesetzt, daß die Menge der Salze, auf Calcium bezogen, 0,05 Proz. betrug. Alle Kulturen enthielten Calciumcarbonat. Die Dauer der Kulturen betrug 21 Tage.

Für die Kulturen wurden Winogradskykolben benutzt; die Nährlösung wurde in solchen Mengen genommen, daß ihre Schicht nicht höher als 5 bis 10 mm war. Sobald die Kultur beendet war, wurde die Reaktion bestimmt, wobei die Flüssigkeit mit Hilfe des Schnabels abgegossen wurde, um eine starke Durchschüttelung der Kultur zu vermeiden.

Die Tabelle V zeigt deutlich den Einfluß des löslichen Calciumsalzes, d. h. des Calciumions, auf die Entwicklung des Citromyces glaber in einer schwach alkalischen und einer fast neutralen Lösung. Vergleichen wir die Kulturen mit einem Zusatz von $(NH_4)_2SO_4$ mit solchen Kulturen, die außer $(NH_4)_2SO_4$ noch $CaSO_4$ enthalten, so sehen wir, daß trotz der gleichen Änderung der Reaktion von p_H 8,3

Tabelle V.

Zusätze zu der Nährlösung		$Ca(NO_3)_2$	$Ca(NO_3)_2$ $(NH_4)_2SO_4$	$CaCl_2$ $(NH_4)_2SO_4$	$CaSO_4$ $(NH_4)_2SO_4$	$(NH_4)_2SO_4$
p_H vor der Aussaat	a	8,4	8,3	8,3	8,3	8,3
	b	8,5	8,3	8,3	8,3	8,3
p_H am Ende des Versuchs	a	6,9	5,8	6,7	6,3	6,3
	b	7,3	5,6	6,3	6,5	6,5
Gewicht des Mycels	a	0,53	0,58	0,53	0,43	0,90
	b	0,31	0,85	0,43	0,43	1,20
Mittel		0,42	0,71	0,48	0,43	1,05
Ca in mg in 100 ccm am Anfang des Versuchs		66	46	51	68	11

bis p_H 6,4 (im Mittel) in den Kulturen ohne $CaSO_4$ das Mycel ein mittleres Gewicht von 1,05 g erreicht, während gleichzeitig in der Kultur mit $CaSO_4$ das Gewicht des Mycels nur 0,43 g beträgt. Auch in allen anderen Kulturen, denen lösliches Calciumsalz zugesetzt wurde, war das Gewicht des Mycels fast um die Hälfte geringer als das entsprechende Gewicht in den Kulturen ohne Zusatz von löslichem Calciumsalz.

Daraus folgt, daß das Calciumion bei einer neutralen oder fast neutralen Reaktion der Nährlösung zweifellos giftig wirkt. Das Säureanion des Calciumsalzes ist ohne Bedeutung. Die Wirkung eines Zusatzes von löslichem Calciumsalz in Gegenwart von $CaCO_3$ und $(NH_4)_2SO_4$ erscheint keineswegs paradox, denn bei der Betrachtung der zwischen den Salzen bestehenden Gleichgewichtsbedingungen ist auch die entstehende Citronensäure zu berücksichtigen, die in der alkalischen Lösung fast das gesamte Calcium ausfällt, so daß merkbare Mengen von Calcium nur in einer gewissen Entfernung von dem Calciumcarbonat möglich sind, wo die Reaktion eine saure oder nahezu neutrale ist. Unter diesen Umständen spielt die Höhe der Schicht der Nährlösung und die Reinheit der Glucose eine ungemein wichtige Rolle. Vielleicht bildet dieses die Ursache für die Widersprüche bei den verschiedenen Autoren.

Die unmittelbare Prüfung der Calciummenge der Lösung zeigt, daß bei einem Zusatz von löslichem Calciumsalz, trotz der alkalischen Reaktion und der Gegenwart von Phosphorsäure, die Menge des Calciums in der Lösung bedeutend zunimmt (68 mg anstatt 11 mg im Falle $CaSO_4$).

V. Stickstoffaufnahme des Mycels bei einer alkalischen und sauren Reaktion der Nährlösung.

Die Versuche *Sabinins* haben gezeigt, daß die Adsorption von Ammonium und Salpetersäure bei einem Eintauchen des Wurzel-

systems der Keimlinge höherer Pflanzen in eine Lösung von NH_4NO_3 bei wechselnder Reaktion der Nährlösung auf verschiedene Weise vor sich geht. Eine ähnliche Erscheinung konnte auch bei den niederen Pflanzen beobachtet werden. Die Nährlösung war die gleiche wie in den anderen Versuchen: Stickstoff in Form von KNO_3 und $(NH_4)_2SO_4$ (0,05 Proz. N). Als Kohlenstoffquelle diente Saccharose. Die Kulturen wurden mit Calciumcarbonat neutralisiert, ihre Dauer betrug 17 Tage. Als Material für die Aussaat diente ein dem Citromyces siderophillus Lieske ähnlicher Pilz, dessen Reinkultur wir im Sommer 1923 auf der hydrobiologischen Station bei dem Glubokoje-See erhielten.

Tabelle VI.

		KNO_3 0,05 Proz. N	KNO_3 0,05 Proz. N + $CaCO_3$	$(NH_4)_2SO_4$ 0,05 Proz. N	$(NH_4)_2SO_4$ 0,05 Proz. N + $CaCO_3$
Gewicht des Mycels	a . . .	1,27	1,29	1,50	1,12
	b . . .	1,39	1,28	1,58	
Mittel . . .		1,33	1,28	1,54	1,12
Stickstoffmenge im Mycel in mg	a . . .	39,3	28,4	33,0	30,2
	b . . .	39,8	31,8	36,6	
Stickstoffgehalt des Mycels in Proz.	a . . .	3,1	2,2	2,2	2,7
	b . . .	2,9	2,5	2,3	
Mittel . . .		3,0	2,3	2,3	2,7
Ausbeute an Citronensäure auf 1 g Mycel	a	0,31	1,8	0,01	1,31
	b	0,74	1,9	0,03	
Mittel		0,78	1,9	0,01	1,31
Ausbeute an Citronensäure in Proz. des Zuckers	a	19,9	30,1	0,0	25,8
	b	16,5	34,1	0,0	
Mittel		18,2	32,1	0,0	25,8

Wie aus der angeführten Tabelle VI zu ersehen, beeinflußt die Reaktion der Nährlösung die Stickstoffaufnahme des Mycels in hohem Grade. So enthält das Mycel in den Kulturen mit Nitratstickstoff in saurer Lösung 3 Proz. N und in den Kulturen mit Calciumcarbonat 2,3 Proz. N. Der Ammoniumstickstoff tritt im Gegenteil in alkalischen Kulturen (mit Calciumcarbonat) besser in das Mycel ein als in sauren. In ersteren enthält das Mycel 2,7 Proz. N, in Kulturen ohne Calciumcarbonat aber nur 2,3 Proz.

Hierbei darf man wohl annehmen, daß die Höhe der Flüssigkeitsschicht von großer Bedeutung für die Entwicklung des Pilzes ist. Bildet die Nährlösung in den Kulturen mit Calciumcarbonat eine hohe Schicht, so kann die Flüssigkeit infolge der langsamen Diffusion der Citronensäure in unmittelbarer Nähe des Mycels stark angesäuert werden, und wenn als Stickstoffquelle Ammonium dient, wird der

Eintritt des Stickstoffs in das Mycel trotz des Überflusses an Ammoniumsalzen in der Lösung stark gehemmt werden.

Die gewonnenen Resultate sind ferner, wie *E. E. Uspenski* in seinen Vorlesungen bereits erwähnt hatte, für die Erklärung des Mechanismus der Entstehung von physiologischen Rassen von großem Interesse. Der Pilz kann neue physiologische Eigenschaften erhalten, wenn sie autokatalytisch zu wirken vermögen. Gerade das ist bei der beobachteten Erscheinung der Fall. Die saure Reaktion der Lösung verringert die Aufnahme von NH_3, und dieses führt wiederum zu einer vermehrten Bildung von Citronensäure. Dadurch wird der Mechanismus des Mazé-Verfahrens verständlich.

VI. Ergebnisse der Versuche.

1. Die optimale Reaktion für die Entwicklung des Citromyces glaber in einer Saccharoselösung mit KNO_3 als Stickstoffnahrung ist bei p_H (etwa) 5,5. Die Höchstgrenze der für die Entwicklung zulässigen Alkalität liegt bei p_H (etwa) 8,7. In einer alkalischen Lösung keimen die Sporen unterhalb der Oberfläche der Flüssigkeit.

2. Die geeignetste Stickstoffquelle für Citromyces glaber bildet in unseren Versuchen $(NH_4)_2SO_4$; KNO_3 ist für die Ernährung dem $(NH_4)_2SO_4$ fast gleichwertig.

3. Bei Vergrößerung der Menge von NH_4NO_3 verringert sich in den Kulturen mit Calciumcarbonat die Ausbeute an Citronensäure; der Pilz entwickelt sich besser.

4. In einer schwach alkalischen und neutralen Lösung übt die Gegenwart des Ca-Ions in der Lösung eine schädliche Wirkung auf die Bildung der Citronensäure und auf die Entwicklung des Pilzes aus. Ein Zusatz von löslichem Mg-Salz neutralisiert zum Teil die schädliche Wirkung des Ca-Ions. Die Art der Sterilisation der Lösung (Calciumcarbonat mit der Lösung zusammen oder beide getrennt; die Ammoniumsalze natürlich getrennt) ist von großer Bedeutung. In einer sauren Lösung übt das Ca-Ion keinen schädlichen Einfluß aus.

5. Der Nitratstickstoff tritt in einer sauren Lösung leichter in das Mycel ein als in einer alkalischen. Ammoniumstickstoff tritt in einer alkalischen Lösung (Kulturen mit Calciumcarbonat) leichter in das Mycel ein als in einer sauren.

Herrn Prof. *E. E. Uspenski* spreche ich hiermit für die mir bei meiner Arbeit erwiesene wertvolle Unterstützung meinen aufrichtigen Dank aus.

Einfache Methode zur Bestimmung des Zuckers im Liquor cerebrospinalis.

Von

Josef Csapó.

(Aus der mit dem Stefanie-Kinderspital in Verbindung stehenden medizinischen Kinderklinik in Budapest.)

(Eingegangen am 14. Februar 1925.)

Die Diagnose der meningealen und cerebralen Erkrankungen bzw. die Differenzierung derselben von anderen Krankheiten stellt die Kliniker öfters vor die schwierigsten Aufgaben. Besonders im Anfang der Krankheit, wenn die klinischen Symptome noch nicht ausgesprochen sind, fühlt man eine gewisse Unsicherheit bei der Aufstellung der Diagnose. Es kommt öfters vor, daß sogar die Untersuchung des Eiweiß-, Zellen- und Bakteriengehalts des Liquor cerebrospinalis nicht zur sicheren Diagnose führt. Es bedeutete in der Liquordiagnostik einen großen Fortschritt die von *Steiner*[1]) und *Csáki*[2]) durch systematische Untersuchungen gemachte Feststellung, daß der Zuckergehalt des Liquor cerebrospinalis bei den meningealen Entzündungen eine starke Abnahme zeigt. Bei der Differentialdiagnose der Meningitiden einerseits, Abscessus und Tumor cerebri andererseits führt uns der Zuckergehalt des Liquor cerebrospinalis auf den richtigen Weg.

Seit den Untersuchungen *Steiners* wird an unserer Klinik in den meningitisverdächtigen Fällen neben dem Eiweiß-, Zellengehalt usw. des Liquors auch der Zuckergehalt in jedem Falle bestimmt. Die Resultate stimmen mit *Steiners* Feststellung vollkommen überein. Es ist also wünschenswert, daß die Bestimmung des Zuckers im Liquor cerebrospinalis in weiterem Kreise Anwendung finde. Daß die Zuckerbestimmung noch nicht genügend weit verbreitet ist, haben vielleicht methodische Schwierigkeiten verursacht. *Steiner* arbeitete bei seinen Untersuchungen mit der Methode von *Bang*, deren Ausführung mehr oder weniger laboratoriumstechnische Geschicklichkeit und außerdem viel Zeit erfordert auch in dem Falle, wenn die notwendigen Lösungen, Kolben, Pipetten vorbereitet sind. An dieser Schwierigkeit will ich mit der folgenden Methode helfen, welche aus den bisher bekannten, viel gebrauchten Methoden mit einigen Änderungen zusammengestellt wurde.

---

[1]) *Steiner*, Jahrb. f. Kinderheilk. **102**.
[2]) *Csáki*, Magyar Orv. Arch. **5**, 1923.

Die Methode ist auf dem *Bertrand*schen Prinzip aufgebaut. $Cu(OH)_2$ wird im alkalischen Medium zu Cu_2O reduziert, welches sich als roter Niederschlag ausscheidet. Das Cu_2O wird isoliert, im schwefelsauren Ferrisulfat gelöst und die durch Cu_2O reduzierte Ferrisulfatmenge mit $KMnO_4$ bestimmt.

Notwendige Lösungen.

1. *Bang*sche Extraktionsflüssigkeit (s. *Pincussen*, Mikromethodik).
2. *Bang*sche Alkalilösung (75 g K_2CO_3 + 20 g Seignettesalz werden in Wasser gelöst und auf 1000 ccm aufgefüllt).
3. Ferrisulfatlösung nach *Bertrand* (50 g $Fe_2(SO_4)_3$ + 200 ccm konzentrierter H_2SO_4 sind mit Wasser auf 1 Liter zu füllen).
4. 5proz. $CuSO_4$-Lösung.
5. n/10 $KMnO_4$.

Ausführung der Bestimmung.

In eine reine trockene Eprouvette pipettiert man 1,5 ccm Liquor und 3 ccm *Bang*sche Extraktionsflüssigkeit, welch letztere die Eiweißkörper ausfällt. Durch ein kleines Filterchen von guter Qualität wird die Flüssigkeit in eine andere Eprouvette filtriert. Von dem Filtrat setzt man 3 ccm (1 ccm Liquor) in ein mit schwefelsaurem Kaliumbichromat gut ausgewaschenes, ein wenig ausgezogenes Zentrifugierröhrchen von 10 bis 12 ccm Inhalt, nun gibt man 1 ccm *Bang*sche Alkalilösung, 2 ccm destilliertes Wasser und 3 bis 4 Tropfen $CuSO_4$ dazu[1]). Mit einem dünnen Glasstab wird der Röhrcheninhalt gut umgerührt und in ein Wasserbad von 70 bis 80° C gestellt. Als Wasserbad diente mir ein mit Wasser gefülltes Becherglas. Vom Beginn des Siedens des Wasserbades wird der Röhrcheninhalt 5 Minuten lang gekocht, inzwischen scheidet sich das Cu_2O als roter Niederschlag aus. Jetzt nimmt man das Zentrifugierröhrchen aus dem Wasserbad und zentrifugiert stark 3 bis 5 Minuten lang, damit sich das Cu_2O auf den Boden des Röhrchens niedersetzt. Die über dem Niederschlag stehende Flüssigkeit wird mit einem Glasrohr, dessen eines Ende zu einer Kapillare ausgezogen ist, mit Hilfe einer Gummikappe abgesaugt, es bleibt im Röhrchen etwa 0,1 ccm Flüssigkeit zurück. Nun gibt man in das Zentrifugierröhrchen 1,5 ccm schwefelsaures Ferrisulfat und rührt mit einem Glasstab (zu diesem Zwecke ist empfehlenswert, eine an beiden Enden eingeschmolzene Kapillare zu gebrauchen) mehrmals um, damit das Cu_2O in Lösung geht, und titriert über weißem Grund mit n/100 $KMnO_4$, bis die Farbe der Permanganatlösung 1 Minute bestehend bleibt. Während des Titrierens ist es zweckmäßig,

[1]) Man kann auch die folgende Zusammenstellung nehmen: 1,5 ccm Liquor und 4,5 ccm Extraktionsflüssigkeit. Von dem Filtrat nimmt man 4 ccm (1 ccm Liquor) und setzt 1 ccm Alkali und 1 ccm destillierten Wassers hinzu.

das schwefelsaure Ferrisulfat mit einem Glasstab öfters umzurühren. Vom Beginn des Titrierens an nimmt man den Glasstab aus dem Zentrifugierröhrchen nicht heraus, um etwaige Ferrisulfatverluste zu vermeiden. Das n/100 $KMnO_4$ wird aus einer n/10 $KMnO_4$-Lösung stets frisch hergestellt. Sind die Reagenzien rein, so beträgt der Blindversuch 0,03 bis 0,05 ccm n/100 $KMnO_4$.

Gang der Überrechnung.

Zum Titrieren gebrauchte man z. B. 2,02 ccm n/100 $KMnO_4$, daraus entfallen auf den Blindversuch 0,03 ccm, diesen Wert abgezogen, bleiben 1,99 ccm. 1 ccm n/100 $KMnO_4$ ist mit 0,636 mg Cu, 1,99 ccm n/100 $KMnO_4$ mit $0,636 \times 1,99 = 1,265$ mg Cu äquivalent. Um das Resultat auf 100 ccm Liquor zu beziehen, muß der obige Cuprumwert noch mit 100 multipliziert werden (126,5 mg). Jetzt sucht man aus der *Bertrand*schen Tabelle das 126,5 mg Cu entsprechende Zuckerprozent heraus (68 mg-Proz.).

Zuerst wurde der Zuckergehalt einer Traubenzuckerlösung von bekannter Konzentration teils nach *Bang*, teils nach der oben angegebenen Methode bestimmt. Da die Resultate gut übereinstimmten, ging ich auf die Untersuchung des Zuckergehalts des Liquor cerebrospinalis über. Als Kontrolle wurde in jedem Falle die Methode von *Bang* angewendet.

Die Zahl der untersuchten Fälle beträgt 22.

Diagnose	Zucker nach	
	modifiz. *Bertrand* mg-Proz.	*Bang* mg-Proz.
Hydrocephalus congenitus	71	73
" "	67	69
" "	49	49
" "	47	46
Chorea minor	61	56
" "	68	63
" "	60	58
Eklampsia	66	72
"	83	87
Epilepsia	74	68
"	66	66
Meningitis cerebrospinalis epidemica . . .	0	0
" " " . . .	34	37
Meningitis tuberculosa	11	14
" "	9	11
" "	14	15
" "	19	20
" "	42	42
" "	14	15
" "	15	14
" "	13	15
" "	14	16

Aus der Tabelle ist ersichtlich, daß die mit den verschiedenen Methoden erhaltenen Resultate gut übereinstimmen. Die Methode von *Bang* ist also bei den klinischen, für diagnostische Zwecke ausgeführten Untersuchungen mit der von mir ausgearbeiteten ersetzbar. Mit dieser Methode kann man sich über den Zuckergehalt des Liquor cerebrospinalis innerhalb 20 bis 25 Minuten leicht orientieren. Begnügt man sich mit einem annähernden Resultat, so kann das Zentrifugieren und Titrieren in den meisten Fällen vollkommen ausbleiben. Während der Liquor mit normalem Zuckergehalt nach dem Kochen eine intensive rote Farbe zeigt, fällt der Zuckergehalt bei Meningitiden schon im Anfang der Krankheit, richtiger gesagt, beim Hineintransportieren in die Klinik, so niedrig aus, daß man nach dem Kochen höchstens geringe oder gar keine Spuren von Reduktion beobachtet.

Allein in den letzten Stadien der Meningitis tuberculosa und bei Meningitis epidemica, wenn der Eiweißgehalt des Liquors zu hoch, der Zuckergehalt dagegen zu niedrig ist (10 bis 20 mg-Proz.), versagt manchmal die Methode, denn in diesen Fällen wird wahrscheinlich der größte Teil des Zuckers durch die Eiweißkörper adsorbiert und beim Ausfällen mitgerissen. Über 20 mg-Proz. gibt die Methode in jedem Falle klinisch brauchbare Werte. Daß der Zuckergehalt des Liquor cerebrospinalis normal sei, weniger oder deutlich verringert ist, kann auch mit dieser Methode mit einer für klinische Zwecke entsprechenden Genauigkeit bestimmt werden. Will man aber bei hohem Eiweiß- und niedrigem Zuckergehalt einen ganz genauen Zuckerwert erhalten, so ist in diesen Fällen die *Bang*sche Methode der von mir ausgearbeiteten vorzuziehen.

Blutgerinnung und die Hofmeistersche Ionenreihe.

Von

Josef Csapó und Dionys v. Klobusitzky.

(Aus der mit dem Stefanie-Kinderspital in Verbindung stehenden Kinderklinik und dem physiologischen Institut der k. Pázmány-Universität in Budapest.)

(Eingegangen am 14. Februar 1925.)

Das Wesen der Blutgerinnung ist die Ausscheidung, die Gelifikation des Fibrinogens infolge der Einwirkung eines Enzyms: des Thrombins. Zur Gerinnung des Blutes ist demnach Fibrinogen und Thrombin notwendig. Die Blutgerinnung kann durch die Beeinflussung dieser beiden Faktoren verhindert werden. Einige von den gerinnungshemmenden Agenzien (Natriumcitrat, Natriumoxalat) sollen angeblich auf die Thrombinbildung schädlich wirken, so daß nach Zugabe dieser Salze keine Gerinnung eintritt, andere ändern eher die physikalisch-chemischen Eigenschaften des Fibrinogens, indem sie seine Stabilität erhöhen, und bei dem stabilen Fibrinogen kann das Thrombin keine erfolgreiche Wirkung entfalten. Die Basen und Säuren hemmen weniger die Bildung des Thrombins, vielmehr erhöhen sie die Stabilität des Fibrinogens. Mit dieser Frage hat sich ausführlich zuerst *Hekma*[1]) beschäftigt. Neutralsalze (NaCl, $NaNO_3$, NaJ usw.) in größerer Konzentration verhindern ebenfalls die Blutgerinnung. Auch da müssen wir zuerst an die Stabilisation des Fibrinogens denken. Die Neutralsalze bilden mit dem Fibrinogen Salzkomplexe, und diese Fibrinogen-Salzverbindungen neigen sich nicht in solchem Maße zur Gelifikation, auch sind diese gegen die physikalischen und chemischen Einwirkungen wiederstandsfähiger als das reine Fibrinogen. Bekannt ist die kolloidchemische Tatsache, daß die Kationen und Anionen der Neutralsalze die physikalischen Eigenschaften der Eiweißkörper (Quellung, Wärmekoagulation, Löslichkeit) in äquivalenter Konzentration in verschiedenem Maße beeinflussen. So entstand die *Hofmeister*sche Ionenreihe,

[1]) *Hekma*, diese Zeitschr. **63**. **64**, **65**, **73**, **74**, **77**.

nach welcher im alkalischen Medium die Löslichkeit der Eiweißkörper unter den Anionen am geringsten von den Sulfaten, am stärksten von den Jodiden und Rhodaniden erhöht wird, unter den Kationen weniger von den Natriumsalzen, etwas mehr von den Kalium- und Ammoniumsalzen. Bei der Fällung findet man das entgegengesetzte Verhalten, die größte Fällungskraft besitzen die Sulfate, die geringste die Jodide und Rhodanide. Da wir die Blutgerinnung durch die Stabilisation des Fibrinogens verhindern können, müssen wir die Ursache der gerinnungshemmenden Wirkung der Salze da suchen. Wir stellten also die Frage: Ist die *Hofmeister*sche Ionenreihe bei der Verhinderung der Blutgerinnung in Geltung oder nicht? Ähnliche Untersuchungen wurden bereits mit Fibrinogenlösungen durchgeführt, aber direkt mit Blut noch nicht.

Methodik.

Es wurde an den zu den Untersuchungen gebrauchten Eprouvetten die Höhe von 10 ccm bezeichnet. Dann haben wir in die reinen, gut ausgetrockneten Eprouvetten entsprechende Mengen des bis Milligramm genau gewogenen, wasserfreien Salzes getan und zur Lösung des Salzes in jedes Röhrchen 2 ccm destillierten Wassers zugesetzt. Das Blut wurde in die Eprouvetten bis zur Marke durch eine paraffinierte Kanüle direkt aus der Carotis des Hundes gefüllt. Nach tüchtigem Umschütteln ließen wir es 48 Stunden bei Zimmertemperatur (18 bis 20° C) stehen. Nach 24 und 48 Stunden haben wir die niedrigste Konzentration der einzelnen Salze, die die Gerinnung noch eben hemmt, abgelesen. Als vollkommene Gerinnung betrachteten wir die Eprouvetten, aus welchen das Blut mit leichtem Schütteln nicht ausgegossen werden konnte.

In der ersten Serie verwendeten wir ausschließlich Kaliumsalze. In die erste Eprouvette wurde so viel wasserfreies, kristallisiertes K_2SO_4 gegeben, daß der K_2SO_4-Gehalt 2 ccm Wassers und 8 ccm Blutes 0,2 Normalität entsprach. Den übrigen Röhrchen wurde in steigender Menge so viel K_2SO_4 zugesetzt, daß die Normalität derselben 0,30, 0,40, 0,54, 0,50, 0,55, 0,60 n betrug. In weitere 6—6 Röhrchen setzten wir KCl bzw. KNO_3 von der folgenden Normalität: 0,30, 0,40, 0,45, 0,50, 0,55, 0,60 und in die letzten 6—6 Röhrchen KJ und KSCN von der Normalität: 0,11, 0,14, 0,17, 0,20, 0,23, 0,26.

Zwecks Raumersparnis teilen wir die Tabellen nicht mit, nur das Endresultat, da es auch ohne Tabellen leicht verständlich ist. Die kleinste Salzkonzentration, die die Gerinnung des Blutes während 24 Stunden verhinderte, war bei K_2SO_4 0,5 n, bei KCl 0,4 n, bei KNO_3 0,35 n, bei KJ 0,2 n, bei KSCN 0,2 n. In der Wirkung des KJ und KSCN fanden wir innerhalb 24 Stunden keine Konzentrationsdifferenz, wir konnten bloß feststellen, daß in den KSCN-haltigen Eprouvetten die Gerinnung nach längerer Zeit eintrat als in den KJ-haltigen bei gleicher Konzentration. Erst nach 48 Stunden zeigte sich eine gewisse

Konzentrationsdifferenz. Das 0,2 n KJ enthaltende Blut war nach 48 Stunden geronnen, während es bei derselben Konzentration von KSCN flüssig blieb. Wir können also die gerinnungshemmende Wirkung der Kaliumsalze in die folgende Reihe stellen: $K_2SO_4 < KCl < KNO_3 < KJ < KSCN$. Diese Reihenfolge stimmt mit der *Hofmeister*schen Reihe vollständig überein. Die Gerinnung des Blutes verhindern in äquivalenter Konzentration am wenigsten die Sulfate, im höchsten Grade die Jodide und Rhodanide.

Da das KBr schwerer löslich ist, hatten wir es aus den oben angegebenen Konzentrationsserien weggelassen. Zur Bestimmung der gerinnungshemmenden Wirkung des KBr haben wir von allen oben genannten Salzen und von KBr eine Serie von 0,2 Normalität bereitet und die Zeit der Gerinnung pünktlich beobachtet. Bei K_2SO_4 trat die Gerinnung in 2 Minuten, bei KCl in 5 Minuten, bei KNO_3 in 70 Minuten, bei KBr in 90 Minuten, bei KJ in 48 Stunden ein, hingegen war bei KSCN das Blut noch nach 48 Stunden flüssig. Das KBr kann also nach seiner gerinnungshemmenden Wirkung zwischen NO_3 und J gesetzt werden. Die Differenz in der gerinnungshemmenden Wirkung der einzelnen Salze ist nicht gleich, vielmehr kann man sie in drei Gruppen einteilen. Sehr nahe zueinander stehen Sulfat und Chlorid (I.), Nitrat und Bromid (II.), Jodid und Rhodanid (III.). Bei den so in drei Gruppen eingeteilten Salzen ist die Wirkungsdifferenz viel prägnanter, besonders scharf ist diese Differenz zwischen der zweiten und dritten Gruppe.

Wie wir gesehen haben, verhindern die Kaliumsalze die Blutgerinnung nach der *Hofmeister*schen Anionenreihe. Im folgenden untersuchten wir, ob wir auch bei den Natrium- und Ammoniumsalzen dieselbe Anionenreihe finden und ob zwischen den Kationen bei demselben Anion eine Wirkungsdifferenz aufzuweisen ist. Zu diesem Zwecke wurde eine Natrium- und Ammoniumserie bereitet, die Konzentration war die gleiche, wie bei der Kaliumserie.

Als Resultat erhielten wir, daß bei Na_2SO_4 0,30 n, bei NaCl 0,45 n, bei $NaNO_3$ 0,40 n, bei NaJ und NaSCN 0,23 n Salzkonzentration die Blutgerinnung 24 Stunden lang vollständig verhinderte. Die Natriumsalze, mit Ausnahme des Sulfats, hemmen im allgemeinen die Gerinnung des Blutes bei höherer Konzentration als die Kaliumsalze. Bei Jodid und Rhodanid konnten wir bloß zeitliche Differenz aufweisen. Das Blut gerann bei einer NaJ-Konzentration von 0,2 n in 8 Stunden, hingegen bei derselben NaSCN-Konzentration in 20 Stunden. Warum das Natriumsulfat eine stärkere Wirkung ausübt als das Kaliumsulfat, wissen wir nicht. Auf keinen Fall kann es durch das Natriumion hervorgerufen werden, da wir bei den übrigen Natriumsalzen das Entgegengesetzte erfuhren.

Von den Ammoniumsalzen konnten wir nur das Sulfat, Chlorid und Nitrat verwenden, da die übrigen (Br, J, SCN) das Blut stark hämolysierten. Die Blutgerinnung wurde von dem Ammoniumsulfat in 0,3 n, von dem Ammoniumchlorid in 0,35 n und von dem Ammoniumnitrat in 0,25 n Konzentration 24 Stunden lang vollkommen verhindert. Die Reihenfolge der Anionen bei den Ammoniumsalzen ist also: $Cl < SO_4 < NO_3$. Bei Vergleichung der Natrium-, Kalium- und Ammoniumsalzwirkung sehen wir, daß das Nitrat überall eine stärker hemmende Wirkung ausübt als das Chlorid, auch die Reihenfolge der übrigen Anionen (J, SCN) stimmt bei den Natrium- und Kaliumsalzen vollständig überein, allein das Sulfat bildet eine Ausnahme, welches seine Stelle je nach den Kationen wechselt. Betrachtet man nur die Chloride und Nitrate, so bemerkt man, daß die hemmende Salzkonzentration bei den Ammoniumsalzen viel geringer ist als bei den Natriumsalzen, zwischen beiden stehen die Kaliumsalze. Die Reihe der Kationen lautet also: $Na < K < NH_4$.

Es stellt sich die Frage, warum die Salze die Blutgerinnung verhindern? Verhindern sie die Bildung des Thrombins oder stabilisieren sie das Fibrinogen? Daß die Salze die Aktivität des Thrombins nach der *Hofmeister*schen Ionenreihe beeinflussen, ist nicht bewiesen, ist auch nicht wahrscheinlich. Nach unserer Meinung liegt die zweite Hypothese, daß die Salze die Stabilität des Fibrinogens erhöhen, näher der Wahrheit. Wenn die Salze die Eiweißkörper nach der *Hofmeister*schen Reihe stabilisieren, weshalb sollte das Fibrinogen eine Ausnahme bilden? Bei stabilisiertem Fibrinogen bleibt die Thrombinwirkung erfolglos, das Blut gerinnt nicht. Bei der Blutgerinnungsforschung müssen wir nicht nur das Enzym, sondern auch den Zustand des Fibrinogens berücksichtigen. Es genügt nicht die Gegenwart von Thrombin und Fibrinogen zur Blutgerinnung, sondern das Fibrinogen muß in solchem Zustand sein, daß die Thrombinwirkung zur Geltung kommen kann. Erhöhen wir auf irgendwelche Weise die Löslichkeit des Fibrinogens, so ist die Thrombinwirkung ebenso, wie die physikalischen Einflüsse (Schlagen mit einem Glasstab usw.) erfolglos, das Fibrinogen zeigt gar keine Neigung zur Ausscheidung.

Heute stehen sich zwei entgegengesetzte Theorien hinsichtlich der Blutgerinnung gegenüber: die alte Enzymtheorie, nach welcher zur Blutgerinnung Thrombin notwendig sei, und die kolloidchemische Theorie, dessen Hauptvertreter *Stuber*[1]) ist, der die Blutgerinnung rein kolloidchemisch erklären will. Wir wollen nicht und — auf unsere Versuche gestützt — wir können auch nicht weder für die eine, noch für die andere Theorie eintreten. Es scheint jedoch, daß die fleißigen

---

[1]) *Stuber* und *Sano*, diese Zeitschr. **134**, 260, 1923.

kolloidchemischen Untersuchungen, die Blutgerinnungsfrage betreffend, nicht erfolglos bleiben, und sie werden die komplizierte und trübe Enzymtheorie — zu deren Entstehungszeiten wir noch sehr wenig von den Kolloiden wußten — verdrängen und einer einfacheren kolloidchemischen Erklärung Raum geben.

Zusammenfassung.

Wir haben untersucht, ob die *Hofmeister*sche Ionenreihe bei der Blutgerinnung gültig ist, und fanden:

1. Die gerinnungshemmende Wirkung der Kaliumsalze entspricht der *Hofmeister*schen Ionenreihe: $SO_4 < Cl < NO_3 < Br < J < SCN$. Die geringste hemmende Wirkung haben die Sulfate, die größte die Jodide und Rhodanide.

2. Bei den Natriumsalzen gestaltet sich die Reihe: $Cl < NO_3 < SO_4 < J < SCN$.

3. Bei den Ammoniumsalzen: $Cl < SO_4 < NO_3$.

4. Die Reihe der Anionen ist bei den untersuchten Salzen mit Ausnahme des Sulfats, welches seine Stelle nach den Kationen wechselt, übereinstimmend.

5. Die Reihe der Kationen lautet: $Na < K < NH_4$. Die geringste hemmende Wirkung entfalten im allgemeinen die Natriumsalze, die größte die Ammoniumsalze, während die Kaliumsalze zwischen beiden stehen.

Osmose einiger Anästhetika in wässerige und lipoidhaltige Gele.

Von

S. Yumikura.

(Aus dem Laboratorium von Prof. *J. Traube*, Technische Hochschule Charlottenburg.)

(Eingegangen am 18. Februar 1925.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

Traube und seine Schüler[1]) haben in früheren Arbeiten festgestellt, daß in wässerigen Lösungen die meisten Alkaloidsalze molekulardispers gelöst sind, daß aber bei Zusatz einer geringen Menge Alkali, also beim Freiwerden der Alkaloidbasen, Submikronenbildung eintritt, insbesondere bei denjenigen Alkaloiden, welchen ein größeres Molekulargewicht zukommt. Während die Lösungen der Alkaloidsalze meist oberflächeninaktiv sind, sind diejenigen der Alkaloidbasen mehr oder weniger oberflächenaktiv, und es zeigte sich ferner, daß ganz insbesondere bei verwandten Stoffen Oberflächenaktivität und Giftwirkung parallel gingen[2]).

Es mußte nun in Hinsicht auf diese Arbeiten von *Traube* und seinen Schülern interessieren, wie sich in Anbetracht der Beziehungen von Oberflächenaktivität zur Osmose Alkaloidsalzlösungen mit und ohne Alkalizusatz bei der Osmose in ein Gel verhielten, und zwar einerseits in ein wässeriges Gel, andererseits in ein wässeriges Gel, welchem gewisse Lecithinmengen zugesetzt waren.

Im Anschluß an die Arbeit von *T. Tomita*[3]) wurde das Eindringen wässeriger Lösungen der folgenden Anästhetika:

1. Novocain $C_{13}H_{20}N_2O_2HCl$, 2. Cocain $C_{17}H_{21}NO_4HCl$,
3. Eucain $C_{15}H_{21}NO_2HCl$, 4. Tutocain $C_{14}H_{22}N_2O_2HCl$,
5. Alypin $C_{16}H_{26}N_2O_2HNO_3$

mit und ohne Alkalizusatz in ein wässeriges Gelatinegel, welchem bestimmte Lecithinmengen zugesetzt waren, untersucht.

Es waren aus der Klasse der Alkaloide gerade diese Anästhetika gewählt worden, weil es besonders interessant erschien, einmal zu

---

[1]) Vgl. *Traube*, diese Zeitschr. **42**, 450, 1912; *Helene Tschernorutzky*, *Traube* und *Onodera*, Intern. Zeitschr. f. physikal. chem. Biol. **46**, 112, 1912; **1**, 35, 1914.

[2]) *Traube*, diese Zeitschr. **98**, 197, 1919.

[3]) *Tomita*, diese Zeitschr. **153**, 335, 1924; s. auch *J. Traube*, ebendaselbst **158**, 358, 1924.

prüfen, ob die anästhetische Wirkung und die Giftwirkung, wie sie bei höheren und niederen Tieren festgestellt worden war, sich vielleicht aus dem osmotischen Verhalten werde ableiten lassen. In der Tat zeigte sich diese Erwartung erfüllt.

Es empfiehlt sich gerade, diesen Teil der Aufgaben, welche ich mir gestellt hatte, zunächst zu behandeln, und die allgemeinen theoretischen Schlüsse werden dann zweckmäßig im Anschluß an die diesbezüglichen Ergebnisse meiner beiden folgenden Arbeiten und diejenigen von *Tomita* in einer Mitteilung von Prof. *Traube* und mir dargestellt.

Methode.

Ich verweise dieserhalb auf die Arbeit von *Tomita*. 7,5 g derselben Gelatine, welche *Tomita* benutzte, wurde in 150 ccm Wasser zu einem 5proz. Sole gelöst, und es wurden alsdann je 50 ccm dieses Sols in den von *Tomita* benutzten zylindrischen Glasschalen von je 12,7 cm Durchmesser zum Gelieren gebracht. Etwa 1 Stunde nach Eingießen des Sols wurden je 30 ccm der zu untersuchenden wässerigen Lösungen auf das Gel gegossen, und die Schalen wurden alsdann mit Glasplatten bedeckt. In bestimmten Zeitabständen fanden die Untersuchungen statt. In Schale 1 wurde die Wasseraufnahme des Gelatinegels durch Feststellung der Volumenverringerung der auf dem Gel lagernden Lösung festgestellt. Aus der zweiten Schale wurden je 5 ccm abpipettiert und in denselben die Alkaloidmengen bestimmt.

Die dritte Schale diente dazu, um aus derselben die 5 ccm Lösung, welche aus der zweiten Schale entnommen waren, sofort wieder ersetzen zu können.

Die lecithinhaltigen Gele wurden in der Weise hergestellt, daß eine bestimmte Lecithinmenge mit der lauwarmen Gelatine-sollösung unter ständigem Rühren im Mörser angerührt wurde, bis eine gleichmäßige feine Suspension erzielt wurde.

Die Gele, welche in dieser Arbeit verwandt wurden, enthielten stets 5 Proz. Gelatine + 2 Proz. Lecithin (von *Merck*).

Die Alkaloidlösungen waren stets 1proz. In bezug auf den Alkalizusatz beschränkte ich mich auf die Untersuchung einer einzigen Konzentration.

Zu 97 ccm der 1proz. Alkaloidsalzlösung wurden 3 ccm n/10 Natronlauge hinzugefügt.

Besondere Sorgfalt wurde auf die Feststellung des Alkaloidgehalts verwandt. Es wurde sehr vorteilhaft die Methode der Fällung mit Pikrinsäure benutzt.

Die Lösungen wurden mit einer 1proz. Pikrinsäurelösung versetzt, der Alkaloidpikratniederschlag wurde auf einem bis 110° getrockneten und gewogenen Filter abfiltriert, indem es selbstverständlich nicht unterlassen wurde, die Filtrate durch weiteren Pikrinsäurezusatz auf noch vorhandenes Alkaloid zu prüfen, und es wurden alsdann die Filter mit den Pikratniederschlägen wieder bei 110° getrocknet und in Wägegläschen eingeschlossen, nach 24stündigem Verweilen im Exsikkator gewogen.

Um der Brauchbarkeit der Methode sicher zu sein, wurde bei allen untersuchten Alkaloiden für verschiedene Konzentrationen der Alkaloidsalzlösungen die Menge des Alkaloidpikrats gewichtsanalytisch bestimmt und graphisch wie in Abb. 1 das Verhältnis von Alkaloid zur Alkaloidpikratmenge dargestellt.

Wie man erkennt, handelt es sich um geradlinige Kurven, die ohne weiteres gestatten, aus einer gewogenen Pikratmenge den Prozentgehalt der Lösungen an Alkaloid abzulesen.

Versuchsergebnisse.

Die folgenden Tabellen sind ohne weiteres verständlich. In Spalte 1 finden sich die Zeiten der Beobachtung. Es wurden dieselben Zeiten gewählt wie in der erwähnten Arbeit von *Tomita*. In den Spalten 2, 4, 6 und 8 finden sich die nach den genannten Zeiten restierenden Lösungsmengen. Sie ergeben ein Maß der Quellung der Gele.

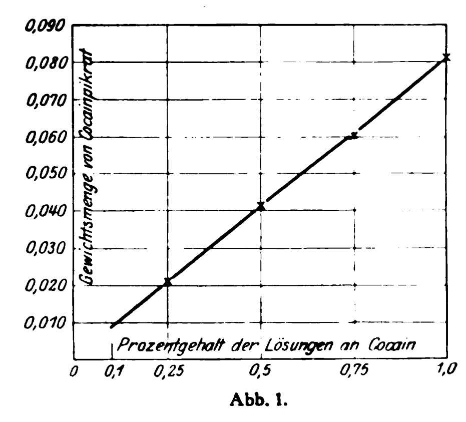


Abb. 1.

In den Spalten 3, 5, 7 und 9 endlich finden sich die mit Hilfe der Pikratmethode bestimmten Alkaloidkonzentrationen.

Tabelle I. Cocain.

Zeit	Ohne Lecithin				Mit Lecithin			
	Ohne Alkalizusatz		Mit Alkalizusatz		Ohne Alkalizusatz		Mit Alkalizusatz	
	Volumen ccm	Prozentgehalt der Lösung	Volumen ccm	Prozentgehalt der Lösung	Volumen ccm	Prozentgehalt der Lösung	Volumen ccm	Prozentgehalt der Lösung
0'	30,0	1,0	30,0	1,0	30,0	1,0	30,0	1,0
3	29,3	0,89	28,9	0,89	29,4	0,86	29,0	0,79
30	28,7	0,75	28,2	0,66	29,0	0,70	28,4	0,66
2h	28,4	0,62	27,3	0,52	28,2	0,50	27,2	0,46
24	26,8	0,42	25,8	0,43	26,7	0,36	25,6	0,34
48	26,1	0,41	25,2	0,44	25,6	0,37	24,6	0,35

Tabelle II. Novocain.

0'	30,0	1,0	30,0	1,0	30,0	1,0	30,0	1,0
3	29,4	0,87	29,0	0,85	29,5	0,83	29,0	0,84
30	29,0	0,74	28,0	0,70	29,0	0,73	27,7	0,69
2h	28,3	0,61	27,0	0,59	28,2	0,63	26,6	0,58
24	26,9	0,50	25,2	0,46	26,2	0,46	23,4	0,46
48	26,1	0,51	24,0	0,47	25,5	0,44	22,4	0,48

Tabelle III. Tutocain.

0'	30,0	1,0	30,0	1,0	30,0	1,0	30,0	1,0
3	29,3	0,97	29,3	0,92	29,4	0,97	29,0	0,89
30	28,7	0,81	28,8	0,80	28,8	0,79	28,1	0,77
2h	28,0	0,62	27,9	0,62	28,0	0,59	27,2	0,59
24	26,2	0,49	26,3	0,49	25,9	0,43	25,2	0,39
48	25,4	0,49	25,8	0,49	25,2	0,42	24,0	0,39

Tabelle IV. Alypin.

Zeit	Ohne Lecithin				Mit Lecithin			
	Ohne Alkalizusatz		Mit Alkalizusatz		Ohne Alkalizusatz		Mit Alkalizusatz	
	Volumen ccm	Prozentgehalt der Lösung	Volumen ccm	Prozentgehalt der Lösung	Volumen ccm	Prozentgehalt der Lösung	Volumen ccm	Prozentgehalt der Lösung
0'	30,0	1,0	30,0	1,0	30,0	1,0	30,0	1,0
3	29,2	0,85	29,0	0,79	29,4	0,84	28,8	0,81
30	28,6	0,73	28,1	0,65	28,8	0,76	28,0	0,68
2h	27,9	0,57	26,8	0,46	27,6	0,58	27,2	0,51
24	26,4	0,42	25,0	0,41	26,1	0,37	24,6	0,30
48	25,4	0,42	24,0	0,39	25,4	0,38	23,9	0,30

Tabelle V. Eucain.

0'	30,0	1,0	30,0	1,0	30,0	1,0	30,0	1,0
3	29,4	0,83	29,1	0,80	29,4	0,84	29,2	0,81
30	29,0	0,70	28,4	0,67	28,9	0,69	28,6	0,67
2h	28,7	0,54	27,6	0,50	28,4	0,50	27,7	0,53
24	27,1	0,43	25,9	0,38	26,4	0,36	25,7	0,35
48	25,9	0,42	25,0	0,38	25,2	0,36	24,7	0,35

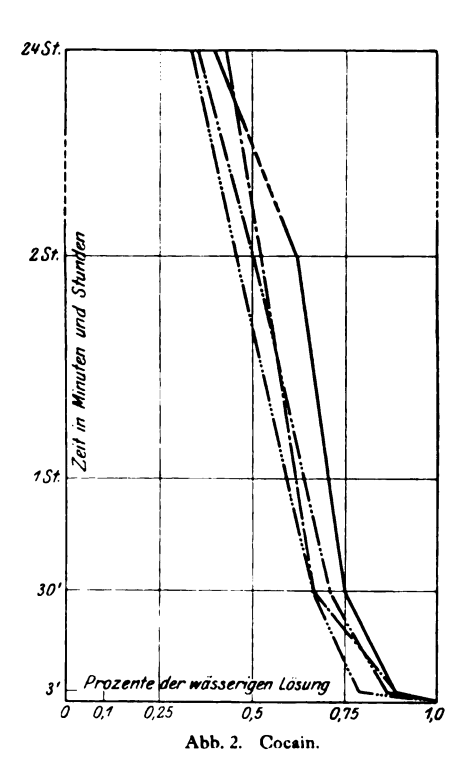


Abb. 2. Cocain.

Bevor wir auf die Ergebnisse der Versuche eingehen, dürfte es sich empfehlen, in den Abb. 2 bis 10 die Versuchsergebnisse, soweit sie sich auf das Eindringen der Alkaloide in das Gelatinegel beziehen, graphisch darzustellen, und daran anschließend in den Tabellen VI und VII die Versuchsergebnisse niederzulegen, welche sich (vgl. Tabelle VI) auf meine *stalagmometrischen* Messungen der Alkaloidsalzlösungen bei wachsendem Alkaligehalt beziehen und (vgl. Tabelle VII) die *narkotischen* bzw. *toxischen* Wirkungen, welche dieselben Lösungen auf Wasserflöhe ausüben.

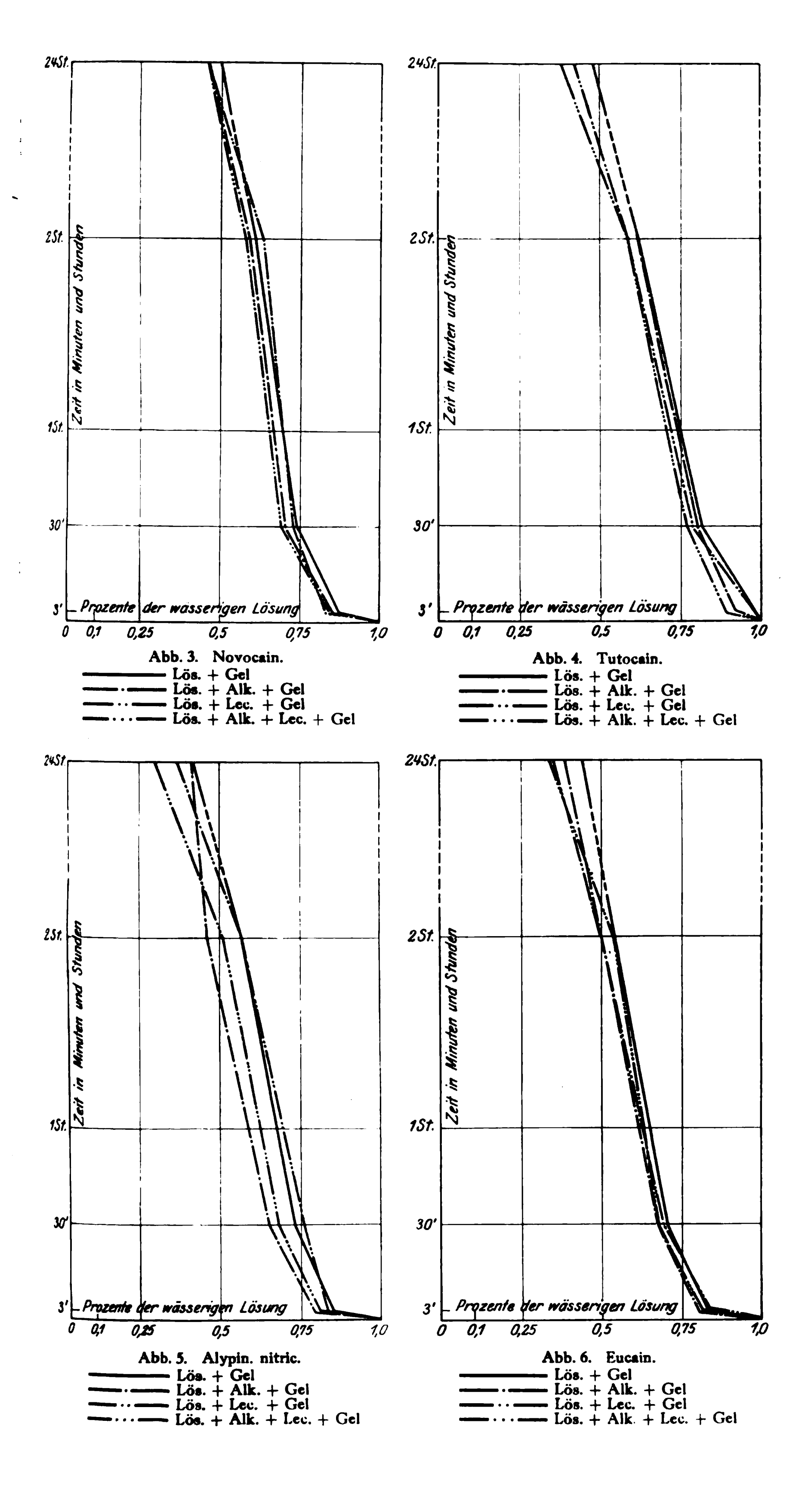


Abb. 3. Novocain.
Lös. + Gel
Lös. + Alk. + Gel
Lös. + Lec. + Gel
Lös. + Alk. + Lec. + Gel

Abb. 4. Tutocain.
Lös. + Gel
Lös. + Alk. + Gel
Lös. + Lec. + Gel
Lös. + Alk. + Lec. + Gel

Abb. 5. Alypin. nitric.
Lös. + Gel
Lös. + Alk. + Gel
Lös. + Lec. + Gel
Lös. + Alk. + Lec. + Gel

Abb. 6. Eucain.
Lös. + Gel
Lös. + Alk. + Gel
Lös. + Lec. + Gel
Lös. + Alk. + Lec. + Gel

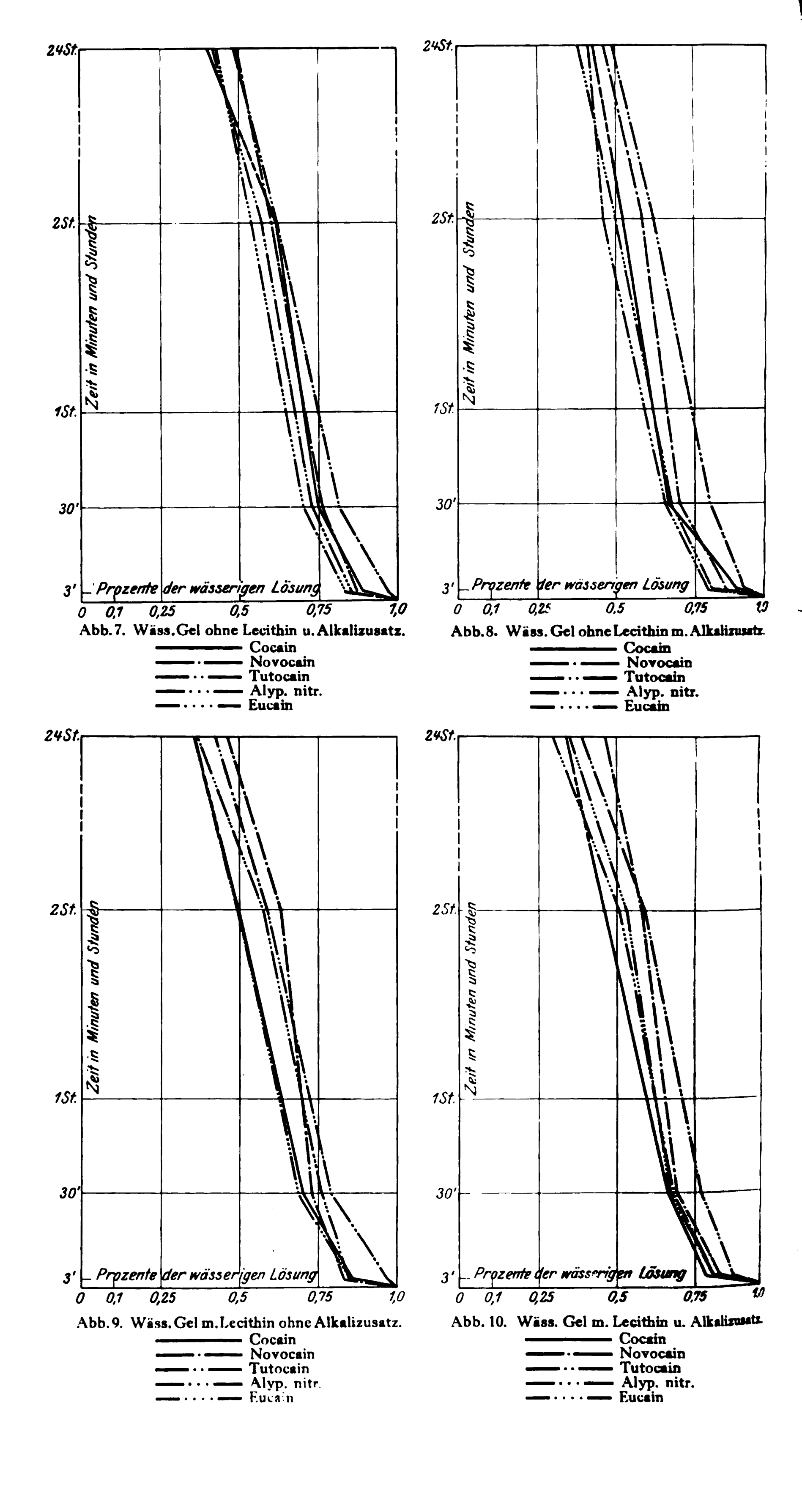


Abb. 7. Wäss. Gel ohne Lecithin u. Alkalizusatz.

Abb. 8. Wäss. Gel ohne Lecithin m. Alkalizusatz.

Abb. 9. Wäss. Gel m. Lecithin ohne Alkalizusatz.

Abb. 10. Wäss. Gel m. Lecithin u. Alkalizusatz.

Tabelle VI. Tropfenzahl (Tropfenzahl des Wassers 54,1).

	Novocain	Cocain	Tutocain	Alypin	Eucain
1proz. Lösung	54,7	55,5	55,2	61,95	57,4
1proz. Lösung 9,9 ccm n/10 Natronlauge 0,1 „	56,5	58,7	58,8	68,19	65,0
1proz. Lösung 9,7 „ n/10 Natronlauge 0,3 „	60,5	65,5	65,5	77,64	74,2
1proz. Lösung 9,5 „ n/10 Natronlauge 0,5 „	63,3	67,7	70,96	opalis.	81,3
1proz. Lösung 9,3 „ n/10 Natronlauge 0,7 „	—	trübe	opalis.	—	85,9
1proz. Lösung 9,1 „ n/10 Natronlauge 0,9 „	—	„	—	—	opalis.
1proz. Lösung 9,0 „ n/10 Natronlauge 1,0 „	69,9 (nicht opalis.)	—	—	—	—

Tabelle VII. Versuche an Wasserflöhen.

	Novocain	Cocain	Tutocain	Alypin nitricum	Eucain
1proz. Lösung 5,0 ccm	49′ 45″	32′ 7″	34′ 37″	12′ 43″	6′ 22″
1proz. Lösung 4,95 „ n/10 Natronlauge 0,05 „	43 50	18 5	24 46	10 8	5 28
1proz. Lösung 4,85 „ n/10 Natronlauge 0,15 „	40 30	17 11	19 45	7 9	4 16
1proz. Lösung 4,75 „ n/10 Natronlauge 0,25 „	40 10	—	14 18	—	2 25
1proz. Lösung 4,50 „ n/10 Natronlauge 0,50 „	31 19	—	—	—	1 50

Die Tabellen VI und VII sollen zuerst besprochen werden. Schon *E. Pribram*[1]) hat im Jahre 1909 im Anschluß an die Ideen und Arbeiten von *J. Traube*[2]) gezeigt, daß in der Cocaingruppe (Tropin, Ekgonin, Benzoylekgonin, Novocain, Cocain, Eucain) die pharmakologische Wirkung der Oberflächenspannung der wässerigen Lösungen parallel ging. Die höchsten Oberflächenspannungswerte ergaben in vergleichbaren Konzentrationen die wässerigen Lösungen von Tropin und Ekgonin, dann folgten Benzoylekgonin und Novocain, während Cocain und Eucainlösungen, entsprechend ihrer Giftigkeit, recht niedrige Oberflächenspannungen ergaben.

[1]) *E. Pribram*, Wien. klin. Wochenschr. **21**, Nr. 30; *Goldschmidt* und *Pribram*, Arch. f. exper. Pathol. u. Therap. **6**, 1, 1899.
[2]) *J. Traube*, diese Zeitschr. **42**, 471, 1912.

Immerhin erschien es nicht überflüssig, die Versuche *Pribrams* und *Traubes* an den von mir untersuchten Alkaloidsalzlösungen zu wiederholen, indem gleichzeitig die Giftwirkung festgestellt wurde.

Die Versuche an Wasserflöhen wurden so ausgeführt, daß je 15 Wasserflöhe in Reagenzgläsern in die betreffenden Lösungen eingesetzt wurden. Die Zahlen in der Tabelle geben die Zeiten in Minuten an, nach welchen sämtliche Wasserflöhe bewegungslos wurden.

Man erkennt, daß die Giftigkeit einer Alkaloidsalzlösung mit zunehmendem Alkaligehalt, also auch zunehmender Oberflächenaktivität, wächst, und vor allem zeigt sich, daß *trotz der durchaus abweichenden Konstitution der untersuchten Alkaloide Giftwirkung und Oberflächenaktivität im allgemeinen parallel gehen.*

Weitaus am ungiftigsten ist die am wenigsten oberflächenaktive Substanz, das *Novocain,* dann folgen *Cocain* und *Tutocain.* Die Oberflächenspannungen sind kaum verschieden, und dementsprechend erkennen wir auch nur geringe Unterschiede der Giftigkeit, *weitaus am giftigsten sind die stark oberflächenaktiven Alkaloide Alypin und Eucain.* Wenn das Alypin eine etwas größere Tropfenzahl als das Eucain zeigt, aber eine etwas geringere Giftigkeit erkennen läßt, so ist darauf hinzuweisen, daß beiden Alkaloiden eine durchaus verschiedene Konstitution zukommt und es sich selbstverständlich hier nur um eine Regel und nicht um ein streng gültiges Gesetz handelt.

Nun aber tritt ein Problem an uns heran: Es zeigt sich, *daß für niedere Tiere, wie Wasserflöhe, unzweifelhaft Alkaloide, wie Alypin und Eucain, weit giftiger sind als Cocain und Tutocain. Wie kommt es, daß für höhere Tiere das Gegenteil der Fall ist?*

So finden wir bei *Hirschberg*[1]) die Tabellen VIII und IX:

Tabelle VIII.

Anästhesierungskraft bei gleicher Dosis		Giftigkeit bei gleicher Dosis		Giftigkeit bei gleicher Anästhesierungskraft	
Cocain = 100	Cocain ist wirksamer	Cocain = 100	Cocain ist giftiger	Cocain ist giftiger als	
Eucain = 40	2,5 mal	Alypin = 30	3,3 mal	Alypin	0,6 mal
Novocain = 25	4 mal	Eucain = 10	10 mal	Novocain	3,1 mal
Alypin = 20	5 mal	Novocain = 8	12,5 mal	Eucain	4 mal

Tabelle IX.

	Kaninchen, Krampfdosis pro 1 kg intravenös	Kaninchen, tödliche Dosis pro 1 kg intravenös	Maus, tödliche Dosis pro 10 g subkutan
Novocain	0,015	0,06	6 mg
Tutocain	0,0075	0,03	3 „
Cocain	—	0,015	—

[1]) *H. Hirschberg,* Deutsch. Monatsschr. f. Zahnheilk. 1924, S. 297.

Die nähere Betrachtung unserer Versuchsergebnisse in den Tabellen I bis V und Abb. 2 bis 10 dürfte uns eine Beantwortung dieser Fragen bringen.

Beachten wir zunächst die Spalten 2, 4, 6 und 8 der Tabellen I bis V, so können wir allgemein feststellen, daß nach 24 bzw. 48 Stunden mehr Wasser in das Gel eingetreten ist bei Zusatz von Alkali zu den Alkaloidsalzlösungen als ohne diesen Zusatz. *Dies gilt sowohl für die lecithinhaltigen wie für die lecithinfreien Gele.* Bedenkt man, daß die *alkalihaltigen Lösungen oberflächenaktiv*, die *alkalifreien* Lösungen *oberflächeninaktiv* sind, so ist man geneigt, die erhöhte Wasseraufnahme teils mit der Erhöhung der Oberflächenaktivität, teils mit dem größeren Alkaligehalt in Beziehung zu setzen.

Was nun die Werte in den Spalten 3, 5, 7 und 9 betrifft, so interessieren uns einmal: die *Geschwindigkeitswerte der Verteilung* der *Alkaloide* bzw. *Alkaloidzusätze* im *Gel* und in der *wässerigen Lösung*, andererseits die *Verteilungswerte* nach *eingetretenem Gleichgewicht*. Wie man erkennt, ist dieses Gleichgewicht bereits nach 24 Stunden eingetreten, da fast allgemein die Werte nach 24 und 48 Stunden gleich groß sind.

Es wird zweckmäßig sein, die graphischen Darstellungen der Versuchsergebnisse näher zu betrachten, zunächst Abb. 2 bis 6. Man beachte die Punktierung am oberen Ende der Ordinatenachse, deren Bedeutung ohne weiteres verständlich sein wird.

Vergleichen wir beispielsweise in Abb. 2 und 3 die Kurven für Cocain und Novocain, so fällt zunächst auf, wie die Kurven für Cocain wesentlich weiter auseinandergehen als diejenigen für Novocain. Das ist für die Wirkungsweise dieser beiden Alkaloide bedeutungsvoll, aber nicht weiter verwunderlich, denn alkalisierte Novocainsalzlösungen sind weit weniger oberflächenaktiv als alkalisierte Cocainsalzlösungen. Daraus resultiert die größere Lecithinlöslichkeit des Cocains und die größere pharmakologische und insbesondere auch toxische Wirksamkeit. Man erkennt beim Vergleich der Cocainkurven 1, 2, 3 und 4, welch bedeutenden Einfluß der Zusatz des Alkalis und andererseits der Lecithinzusatz zum Gelatinegel sowohl auf die Geschwindigkeit der Alkaloidaufnahme wie auch auf die Gleichgewichtskonzentration im Gegensatz zum Novocain ausübt, bei welchen die vier Kurven nicht allzusehr voneinander abweichen.

Für das *Tutocain* (vgl. Abb. 4) zeigt sich derselbe beschleunigende Einfluß des Alkali- sowie des Lecithingehalts auf die Geschwindigkeit des Eindringens des Alkaloids in das Gel wie für Cocain, nur befinden sich die Kurven enger aneinander, d. h. die Unterschiede sind nicht so groß wie bei dem Cocain.

Dies ist indessen der Fall bei dem *Alypin* (s. Abb. 5). Hier gehen die Kurven weit auseinander, aber es zeigt sich etwas Bemerkenswertes. *Während die Geschwindigkeit des Eindringens des Alkaloids in das Gel für die nicht mit Alkali versetzten Lösungen sehr gering bleibt, gleichgültig, ob das Gel lecithinhaltig ist oder nicht, bringt der Alkalizusatz eine erhebliche Beschleunigung hervor, die für das lecithinfreie Gel am bedeutendsten ist.*

Ähnlich liegen die Verhältnisse beim *Eucain* (vgl. Abb. 6). Zwar liegen die Kurven dichter aneinander, indessen auch hier erhöht der Alkaligehalt der Gele die Aufnahmegeschwindigkeit des Alkaloids, *während der Lecithingehalt nicht nur nicht fördernd auf jene Größe wirkt, sondern dieselbe sogar verringert.*

Noch übersichtlicher wird das Verhalten der verschiedenen Alkaloide, wenn man die Abb. 7 bis 10 betrachtet. Die Abb. 7 führt in bezug auf das Verhalten *der wässerigen Gele bei Abwesenheit von Lecithin und Alkali zu folgenden Reihenfolgen:*

Verteilungsgeschwindigkeit.

Eucain > Alypin > Novocain > Cocain > Tutocain.

Verteilung im Gel : Lösung nach 24 und 48 Stunden.

Cocain > Alypin > Eucain > Tutocain > Novocain.

Abb. 8 stellt das Verhalten des *wässerigen Gels ohne Lecithin,* aber *mit Alkalizusatz* zu den *Alkaloidsalzlösungen* dar.

Die Reihenfolgen sind:

Verteilungsgeschwindigkeit.

Alypin > Eucain > Cocain > Novocain > Tutocain.

Verteilung im Gel : Lösung nach 24 und 48 Stunden.

Eucain > Alypin > Cocain > Novocain > Tutocain.

Das Verhalten *des wässerigen Gels mit Lecithinzusatz ohne Alkalizusatz ist dargestellt* in den Kurven der Abb. 9.

Verteilungsgeschwindigkeit nach 3 Minuten.

Novocain > Eucain > Cocain > Alypin > Tutocain.

Verteilung in Gel : Lösung nach 24 und 48 Stunden.

Cocain > Eucain > Alypin > Tutocain > Novocain.

Abb. 10 endlich stellt die Kurven dar, welche das Verhalten *des wässerigen Gels mit Lecithinzusatz und Alkalizusatz zu den Alkaloidlösungen darstellen.*

Verteilungsgeschwindigkeit.

Cocain > Eucain > Alypin > Novocain > Tutocain.

Verteilung in Gel : Lösung nach 24 und 48 Stunden.

Alypin > Cocain > Eucain > Tutocain > Novocain.

Weiter oben wurde die Frage aufgeworfen, woher es kommt, daß für *niedere Tiere*, wie Wasserflöhe usw., Alypin und Eucain in Übereinstimmung mit den stalagmometrischen Messungen die größte narkotische bzw. toxische Wirkung ausüben, während bekanntlich für *höhere Tiere* die Wirkung des Cocains weit bedeutender ist.

Die soeben besprochenen Versuche dürften eine Antwort auf diese Frage geben.

Die Geschwindigkeit des Eintritts in ein *lipoidfreies Gel*, wie lecithinfreies Gelatinegel, war für Alypin und Eucain größer als für Cocain, gleichgültig, ob die Alkaloidlösung Alkali enthielt oder nicht, dagegen war die Geschwindigkeit des Eintritts in ein *lipoidhaltiges Gel*, wie lecithinhaltiges Gelatinegel, für Cocain größer als für Alypin und Eucain und die übrigen Alkaloide, namentlich sobald den Alkaloidlösungen Alkali zugesetzt wurde.

Bei der Narkose und Vergiftung niederer Tiere handelt es sich aber in erster Linie um den Eintritt der Gifte in Zellen, welche im Vergleich zu den Zellen der höheren Tiere sehr wenig lipoidreich sind. Der verschiedene Lipoidgehalt der Zellen dürfte in erster Linie für die verschiedene Wirkung von Anästheticis, wie Alypin, Eucain und Cocain maßgebend sein.

Auch die Verteilung der Gifte im Gel: Lösung nach Eintritt des Gleichgewichts, also nach längerer Zeit, dürfte für die Giftwirkung, namentlich bei höheren Tieren, nicht gleichgültig sein. Aber insbesondere ist für eine gute Anästhesie oder Narkose maßgebend die Geschwindigkeit des Eintritts des Anästhetikums in den ersten Minuten. Nach dieser Richtung zeichnet sich besonders das *Novocain* aus (vgl. weiter oben), auch besonders dadurch, daß trotz großer Anfangsgeschwindigkeit des Eintritts in das Gel, namentlich wenn lecithinhaltig, die Menge des aufgenommenen Novocains nach Eintritt des Gleichgewichtszustandes, also nach längerer Zeit, von allen Alkaloiden am geringsten ist.

Zusammenfassung.

Wässerige Lösungen von Anästheticis, wie Cocain, Novocain, Tutocain, Alypin und Eucain wurden ohne und mit Alkalizusatz über ein Gel geschichtet, welches aus wässeriger Gelatine ohne und mit Lecithinzusatz bestand.

Es wurden die Geschwindigkeiten bestimmt, mit welchen Wasser sowie die Alkaloidsalze bzw. durch Alkali frei gemachte Alkaloide in das lipoidfreie wie lipoidhaltige Gel eintraten, ferner die Verteilungen der Alkaloidsalze bzw. Alkaloide zwischen Gel und wässeriger Lösung nach eingetretenem Gleichgewicht.

Ferner wurden stalagmometrische Messungen an den mit mehr oder weniger Alkali versetzten Alkaloidsalzlösungen ausgeführt und narkotische bzw. toxische Versuche an Wasserflöhen.

Es ergab sich unter anderem in Übereinstimmung mit den stalagmometrischen Messungen, daß gegenüber den Wasserflöhen Alypin und Eucain weit giftiger waren als Cocain und Tutocain, am ungiftigsten war Novocain.

Die Tatsache, daß Cocain für höhere Tiere weitaus giftiger ist als Alypin und Eucain, fand durch die Versuche dieser Arbeit eine befriedigende Deutung, insofern sich zeigte, daß die Eintrittsgeschwindigkeit in das Gel für Alypin und Eucain am größten war, sofern das Gel lipoidfrei war. Wurde aber Lecithin zugesetzt, so trat namentlich bei Gegenwart von Alkali das Cocain schneller in das Gel ein als Alypin und Eucain. Da nun die in Betracht kommenden Zellen der höheren Tiere wesentlich lipoidreicher sind als diejenigen der niederen Tiere, so könnte sehr wohl das verschiedene Verhalten von Alypin und Eucain, sowie andererseits Cocain gegen die verschiedenen Tierklassen auf den verschiedenen Lipoidgehalt und die verschiedene Eintrittsgeschwindigkeit zurückzuführen sein.

Auch die Verteilung der Alkaloide im Gleichgewichtszustand zwischen Gel und Lösung steht mit diesen Betrachtungen im Einklang.

Ebenso findet das günstige Verhalten des Novocains durch die hier vorliegende Arbeit eine Erklärung.

Osmose in wässerigem Gel ohne und mit Lipoidzusatz.

Von

S. Yumikura.

(Aus dem Laboratorium von Prof. *J. Traube*, Technische Hochschule Charlottenburg.)

(*Eingegangen am 18. Februar 1925.*)

Die vorliegende Arbeit bildet eine Ergänzung der in dieser Zeitschrift erschienenen Mitteilungen von *T. Tomita*[1]), „Über Adsorption und Osmose in Gelen", und die sich daran anschließende Arbeit von *J. Traube*[2]) über Oberflächenaktivitätstheorie und Lipoidtheorie.

Tomita hat die Aufnahme oberflächenaktiver Stoffe, wie Fettsäuren, Alkohole usw., zunächst in einem 5proz. wässerigen Gelatinegel verglichen mit der Aufnahme in einem 5proz. Gelatinegel, in welchem 2 Proz. *Merck*sches Lecithin fein emulgiert waren.

Prof. *Traube* hielt es indessen für wünschenswert, auch derartige Gele zum Vergleich heranzuziehen mit höherem Lecithingehalt, und so wurde — s. die folgenden Tabellen I und II — zunächst der Eintritt einer n/320 Caprylsäurelösung in ein 5proz. Gelatinegel ohne und mit 2, 5 und 8 Proz. Lecithingehalt bei Zimmertemperatur, etwa 18°, untersucht.

Über die Herstellung der Lösungen vergleiche die vorhergehende Mitteilung, ebenso über die sonstige Ausführung der Versuche. Wie in der ersten Mitteilung wurden auch hier in denselben Schalen 50 ccm der Gele mit 30 ccm der Lösungen überschichtet.

Die Konzentrationsbestimmung der Caprylsäurelösungen nach den in Spalte 1 gegebenen Zeiten konnte nur mit Hilfe der stalagmometrischen Methode ausgeführt werden. Die Zahlen der Tabellen I und II bezeichnen die Tropfenzahlen bei Verwendung eines Stalagmometers, dessen Tropfenzahl für Wasser = 53,8 war.

Mit Hilfe der Tabelle III kann man aus den Tropfenzahlen die Konzentrationen berechnen.

---

1) *Tomita*, diese Zeitschr. **153**, 335, 1924.
2) *J. Traube*, ebendaselbst **153**, 358, 1924.

Tabelle I. Tropfenzahl.

Zeit	5 Proz. Gelatine + n/320 Caprylsäure	5 Proz. Gelatine + 2 Proz. Lecithin + n/320 Caprylsäure	5 Proz. Gelatine + 5 Proz. Lecithin + n/320 Caprylsäure	5 Proz. Gelatine + 8 Proz. Lecithin + n/320 Caprylsäure
0'	95,3	95,3	95,3	95,3
3	90,8	88,9	87,7	86,4
15	89,6	84,3	80,8	76,9
30	83,9	79,6	75,6	72,1
1h	80,7	73,5	70,9	68,1
2	77,2	70,8	67,6	65,5
24	73,1	66,4	65,5	64,4
48	—	66,3	65,8	66,0

Tabelle II. Kontrolle.

Zeit	5 Proz. Gelatine + Wasser	5 Proz. Gelatine + 2 Proz. Lecithin + Wasser	5 Proz. Gelatine + 5 Proz. Lecithin + Wasser	5 Proz. Gelatine + 8 Proz. Lecithin + Wasser
0'	53,8	53,8	53,8	53,7
3	53,8	54,6	54,7	54,0
15	53,5	56,4	55,0	54,8
30	53,4	57,4	55,5	56,0
1h	56,2	58,5	57,0	57,3
2	57,0	59,7	58,1	59,6
24	58,5	62,5	61,6	63,7
48	58,0	62,6	62,8	64,1

Tabelle III. Caprylsäure.

Normalität der Lösung	Tropfenzahl	Normalität der Lösung	Tropfenzahl
n/320 . . .	95,4	n/5120 . .	54,7
n/640 . . .	77,5	n/10240 . .	54,3
n/1280 . .	66,1	Wasser (dest.)	54,0
n/2560 . .	57,6		

Leider ist, wie bereits in der Arbeit von *Tomita* erwähnt wurde, die stalagmometrische Methode gerade bei den Gelatinegelen in quantitativer Hinsicht nicht sehr genau, da auch bei der Überschichtung der Gele mit reinem Wasser mit der Zeit eine erhebliche Zunahme der Tropfenzahlen statthat. Tabelle II enthält die diesbezüglichen Werte, welche als Korrektionswerte dienen.

Immerhin führen die Versuche zu dem gewiß nicht unwichtigen Ergebnis, *daß die stark oberflächenaktive Caprylsäure mit zunehmendem Lipoidgehalt des Gels mit wachsender Geschwindigkeit aufgenommen wird, und in den lipoidhaltigen Gelen ist die Aufnahme der Caprylsäure nach eingetretenem Gleichgewicht nahezu vollständig.* Bemerkenswert ist die doch immerhin *recht allmähliche Aufnahme* der Caprylsäure. Nach besonderen Versuchen von *Tomita* (vgl. l. c.) ändert hieran ein ständiges Bewegen der Schalen sehr wenig.

Es wurden ferner in ganz gleicher Weise Versuche mit n *Buttersäure* ausgeführt. Hier wurden je 5 ccm der wässerigen Buttersäurelösung mit n Natronlauge und Neutralrot titriert. Tabelle IV enthält die Buttersäurekonzentrationen nach den in Spalte 1 angegebenen Zeiten, wenn die Buttersäurekonzentration bei Beginn der Versuche gleich 5.0 gesetzt wurde.

Tabelle IV. Titration (mit n Natronlauge titriert).

Zeit	5 Proz. Gelatine + n Buttersäure	5 Proz. Gelatine + 2 Proz. Lecithin + n Buttersäure	5 Proz. Gelatine + 5 Proz. Lecithin + n Buttersäure	5 Proz. Gelatine + 8 Proz. Lecithin + n Buttersäure
0′	5,0	5,0	5,0	5,0
3	4,6	4,3	4,0	3,8
15	4,1	4,0	3,5	3,4
30	3,7	3,6	3,3	3,1
1h	3,2	3,1	2,6	2,7
2	2,4	2,4	2,3	2,2
24	—	1,7	1,7	1,6

Buttersäure ist weit weniger oberflächenaktiv als Caprylsäure, aber immerhin noch stark oberflächenaktiv. Man erkennt einen Einfluß des Lecithingehalts auf die Geschwindigkeit der Osmose, der aber weniger groß ist als bei Caprylsäure, insbesondere erkennt man, daß nach 24 Stunden noch erhebliche Buttersäuremengen in der wässerigen Lösung sind, deren Menge allerdings[1]) infolge der Quellung des Gels sehr erheblich abnimmt. Bei dem lecithinfreien Gel ist die Menge der Lösung bereits nach 24 Stunden gleich 0 geworden.

Es wurden alsdann, um die Geschwindigkeit der Diffusion verschieden stark oberflächenaktiver Stoffe in lipoidfreien und lipoidhaltigen Gelen zu untersuchen, mit *Essigsäure* und *Buttersäure* Reagenzglasversuche in der Weise angestellt[1]), daß je 12 ccm eines 3proz. Gelatinesols ohne und mit 2 Proz. Lecithinzusatz geliert wurden und diese Gele mit 3 ccm n/1 sowie $^1/_{10}$ n wässeriger Essigsäure- bzw. Buttersäurelösungen überschichtet wurden. Den Gelen waren minimale Mengen Neutralrot zugesetzt.

Tabelle V. Essigsäure.

Zeit	Ohne Lecithin		Mit Lecithin	
	n	n/10	n	n/10
10′	0,3 ccm	0,25 ccm	0,4 ccm	0,3 ccm
30	0,5 „	0,35 „	0,6 „	0,4 „
1h	0,7 „	0,5 „	0,7 „	0,5 „
2	1,0 „	0,7 „	1,0 „	0,7 „
24	3,4 „	2,4 „	2,9 „	2,0 „
48	4,8 „	3,4 „	4,2 „	2,9 „

[1]) Vgl. *Tomita*, diese Zeitschr. **153**, 335 u. f., 1924.

Tabelle VI. Buttersäure.

Zeit	Ohne Lecithin		Mit Lecithin	
	n	n/10	n	n/10
10′	0,3 ccm	0,25 ccm	0,35 ccm	0,25 ccm
30	0,5 „	0,3 „	0,5 „	0,3 „
1h	0,7 „	0,45 „	0,65 „	0,45 „
2	0,9 „	0,6 „	0,9 „	0,6 „
24	3,0 „	2,1 „	2,6 „	1,7 „
48	4,3 „	2,9 „	3,8 „	2,4 „

Man erkennt, daß zunächst Essigsäure wie Buttersäure sowohl im lipoidfreien wie lipoidhaltigen Gel annähernd gleich schnell vordringen, allmählich zeigt sich indessen, daß die weniger oberflächenaktive Essigsäure offenbar infolge der größeren quellenden Wirkung sowohl im lipoidfreien wie lipoidhaltigen Gel etwas schneller vordringt.

Um den Einfluß der Säurequellung auszuschalten, wurden noch eine Anzahl Versuche ausgeführt mit *Octylalkohol-* und *i-Amylalkohollösungen.*

Hier wurde gleichfalls in Ergänzung der Versuche von *Tomita* anstatt des Gelatinegels ein *Eiereiweißgel* verwandt *ohne* und *mit Zusatz verschiedener Mengen von Eigelb.*

Das Eiweiß eines Hühnereis mit und ohne Zusatz des Eigelbs wurde in den beschriebenen Glasschalen von 12,7 cm Durchmesser 7 Minuten lang auf einem Wasserbade mit siedendem Wasser erwärmt. Nach ½stündigem Abkühlen wurden dann die Gele mit 30 ccm der betreffenden Lösungen überschichtet. Das Eigelb wurde vorher im Mörser mit dem Eiweiß gut verrührt. Die Konzentrationsbestimmungen erfolgten auf stalagmometrischem Wege.

Tabelle VII zeigt die Ergebnisse beim Octylalkohol. Tabelle VIII enthält die Änderungen der Tropfenzahlen bei Verwendung reinen Wassers und Tabelle IX die Änderung der Tropfenzahlen von Octylalkohollösungen mit der Konzentration.

Tabelle VII. Tropfenzahl (Octylalkohol).

Zeit	2 Eiweiß + gesättigte wässerige Octylalkohollösung	2 Eiweiß + 1 Eigelb + gesättigte wässerige Octylalkohollösg.	1 Eiweiß + 2 Eigelb + gesättigte wässerige Octylalkohollösung	1 Eiweiß + 3 Eigelb + gesättigte wässerige Octylalkohollösung
0′	115,3	115,4	115,3	115,3
3	109,0	100,2	100,5	102,5
15	98,3	88,4	88,2	92,0
30	92,2	82,2	82,3	84,2
1h	87,9	77,4	78,0	78,1
2	83,2	73,5	72,2	74,6
24	74,0	69,2	66,2	71,6

Tabelle VIII. Tropfenzahl (Kontrolle).

Zeit	2 Eiweiß + dest. Wasser (30,0 ccm)	2 Eiweiß + 1 Eigelb + dest. Wasser (30,0 ccm)	1 Eiweiß + 2 Eigelb + dest. Wasser (30,0 ccm)	1 Eiweiß + 3 Eigelb + dest. Wasser (30,0 ccm)
0'	53,8	53,8	54,0	53,9
3	54,1	55,2	64,8	65,2
15	54,2	55,7	65,4	66,5
30	55,1	56,5	65,4	67,2
1h	55,4	56,8	65,9	68,0
2	56,0	57,5	66,4	69,0
24	56,7	60,2	67,9	70,7

Tabelle IX. Tropfenzahl.

In Wasser	Octylalkohol	Amylalkohol	In Wasser	Octylalkohol	Amylalkohol
Gesättigte Lös.	115,0	138,0	1/8 gesättigte	66,7	72,6
1/2 gesättigte	92,2	105,7	1/16 "	59,8	63,9
1/4 "	75,7	85,9			

Bei Berücksichtigung der Tabelle VIII erkennt man, daß mit zunehmendem Lipoidgehalt (Eigelb) die Geschwindigkeit der Aufnahme des Octylalkohols in das Gel zunimmt, auch hier zeigt sich wie bei den Caprylsäureversuchen, daß nach 24 Stunden in den lipoidreichen Gelen so gut wie aller Octylalkohol aufgenommen ist. Auch hier ist man einigermaßen verwundert, daß die Aufnahme des Octylalkohols durch die Gele nicht schneller erfolgt. Aus der Tabelle X in Verbindung mit den Tabellen VIII und IX erkennt man das Verhalten des i-Amylalkohols.

Tabelle X. Tropfenzahl (Amylalkohol).

Zeit	2 Eiweiß + gesättigte wässerige Amylalkohollösung	2 Eiweiß + 1 Eigelb + gesättigte wässerige Amylalkohollösg.	1 Eiweiß + 2 Eigelb + gesättigte wässerige Amylalkohollösung	1 Eiweiß + 3 Eigelb + gesättigte wässerige Amylalkohollösung
0'	138,4	138,4	138,4	139,1
3	130,9	132,0	130,9	134,6
15	120,4	123,3	121,8	124,3
30	114,9	116,3	114,1	117,1
1h	108,3	109,6	106,4	109,6
2	102,9	102,3	102,9	103,0
24	91,1	88,1	82,7	84,5
48	90,1	86,6	80,2	82,6

Es zeigt sich, daß auch bei diesem noch stark oberflächenaktiven Alkohol die Geschwindigkeit der Osmose mit wachsendem Lipoidgehalt zunimmt, daß aber nach 24 Stunden im Gegensatz zum Octylalkohol noch ein erheblicher Prozentgehalt an Amylalkohol in der wässerigen Lösung enthalten ist.

Zusammenfassung.

Es hat sich gezeigt, daß stark oberflächenaktive Stoffe, wie Caprylsäure und Octylalkohol, um so geschwinder in ein wässeriges Gel (Gelatine, Eiweiß) eindringen, je lipoidreicher es ist. In den lipoidreichen Gelen ist nach 24 Stunden nahezu die Gesamtmenge jener Stoffe in das Gel eingetreten.

Bei weniger oberflächenaktiven Stoffen, wie Buttersäure und i-Amylalkohol, besteht in bezug auf die Geschwindigkeit des Eindringens in die Gele auch ein Unterschied zugunsten der lipoidreichen Gele, der aber weniger bedeutend ist als für die obigen, stärker oberflächenaktiven Stoffe. Nach eingetretenem Gleichgewicht findet eine Verteilung statt, derart, daß noch erhebliche Substanzmengen in der wässerigen Lösung sind.

Die Diffusionsgeschwindigkeit beim Eindringen von Essigsäure und Buttersäure in ein lecithinfreies und lecithinhaltiges Gelatinegel ist anfangs annähernd gleich groß, wird aber allmählich für die Essigsäure etwas größer.

Über Osmose einiger Säuren in ein Gelatinegel.

Von

S. Yumikura.

(Aus dem Laboratorium von Prof. *J. Traube* an der Technischen Hochschule Charlottenburg.)

(Eingegangen am 18. Februar 1925.)

T. Tomita[1]) hat kürzlich in einer Arbeit über Adsorption und Osmose in Gelen das Eindringen etlicher in Wasser gelöster Stoffe in verschiedene Gele untersucht und gleichzeitig auch die Geschwindigkeit und Größe der Wasseraufnahme durch die Gele festgestellt. *Tomita* hat indessen seine Untersuchungen nur auf Lösungen oberflächenaktiver Stoffe, wie Fettsäuren, Alkohole usw. ausgedehnt.

Es erschien nun wünschenswert, die Untersuchungen auch mit einigen oberflächeninaktiven anorganischen Säuren, wie Salzsäure und Schwefelsäure, ferner mit den ja auch biologisch wichtigen, nur wenig oberflächenaktiven Säuren, Milchsäure und Ameisensäure, durchzuführen.

Zwar liegen Untersuchungen über die Quellungserscheinungen bei derartigen Säuren schon mehrfach vor, indessen Herrn Prof. *Traube* und mir mußte daran liegen, gerade nach der von *Tomita* für oberflächenaktive Säuren, wie Essigsäure, Buttersäure und Caprylsäure angewandten Methode auch die oben genannten Säuren zu untersuchen, um in erster Linie das Verhalten oberflächenaktiver und oberflächeninaktiver Säuren in bezug auf die Geschwindigkeit des Eindringens in Gele und die Verteilung nach eingetretenem Gleichgewicht vergleichen zu können.

Die Untersuchungen wurden nur auf ein *Gelatinegel* ausgedehnt.

Je 50 ccm eines 5proz. wässerigen Gelatinesols (s. die vorhergehenden Arbeiten) wurden in drei zylindrischen Glasschalen von 12,7 cm Durchmesser zum Gelieren gebracht, und etwa 1 Stunde danach wurden die

[1]) *T. Tomita*, diese Zeitschr. **153**, 335, 1924.

Gele mit je 30 ccm der wässerigen Lösungen der genannten Säuren von verschiedener Normalität überschichtet. Die Schalen wurden mit Glasschalen bedeckt, und es wurde nun in der ersten Schale nach 3, 15, 30 Minuten, nach 1, 2 und 24 Stunden die Wasseraufnahme durch das Gel festgestellt, aus Schale 2 wurden nach den genannten Zeiten je 2,5 ccm der Lösung abpipettiert und mit Natronlauge gleicher Normalität unter Zusatz von Neutralrot titriert. Schale 3 diente dazu, um die aus Schale 2 wiederholt entnommenen 2,5 ccm wieder zu ersetzen. Auf diese Weise wurde die Abnahme der Säurekonzentration in der wässerigen Lösung festgestellt, und daraus wurden unter Berücksichtigung der Volumenverringerung der Lösung mit der Zeit die *Molzahlen* in der Lösung und im Gel nach verschiedenen Zeiten bestimmt (vgl. auch *Tomitas* erste Arbeit, l. c.).

In Tabelle I finden sich in Spalte 1 die Beobachtungszeiten in Minuten und Stunden, und in den folgenden Spalten in Kubikzentimetern die Mengen der Lösungen, welche nach den angegebenen Zeiten noch vorhanden waren.

Tabelle I.

Quellungen des Gels durch Säuren und Salze.

Zeit	Salzsäure				Schwefelsäure		
	n	n/5	n/10	n/50	n	n/5	n/10
0′	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
3	29,0	27,9	27,6	24,8	29,1	28,0	27,8
	(28,8)				(28,6)		
15	28,4	26,2	25,2	21,7	28,3	27,0	26,0
	(28,4)				(27,8)		
30	27,2	25,0	23,0	19,5	27,8	26,0	24,3
	(27,4)				(26,8)		
1h	26,3	22,4	19,6	16,3	26,7	24,8	21,7
	(26,0)				(25,2)		
2	24,6	20,1	15,8	14,7	24,8	22,4	19,4
	(23,7)				(23,7)		
24	12,3	4,2	0	9,2	18,0	12,8	4,2
	(6,2)				(10,1)		

Zeit	Milchsäure und ihre Salze						Ameisensäure und ihre Salze				
	n	n/2	n/5	n/10	n Milchsäure (15,0 ccm), n/2 milchsaur. Natron (15,0 ccm)	n/2 milchsaures Natron	n	n/2	n/5	n Ameisens. (15,0 ccm), n/2 ameisensaur. Natron (15,0 ccm)	n/2 ameisensaur. Natron
0′	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0	30,0
3	25,0	23,6	23,2	23,2	28,6	30,0	25,0	24,0	24,3	29,2	29,6
15	22,6	20,6	19,8	19,2	28,1	30,0	21,9	21,0	20,0	28,6	29,2
30	19,1	16,9	15,9	15,9	27,2	29,7	18,9	17,4	16,8	28,0	28,9
1h	15,1	12,2	12,4	12,4	26,0	29,5	14,1	13,5	12,4	27,2	28,4
2	10,2	6,4	8	8,5	24,2	29,1	9,5	8,2	8,2	25,3	27,6
24	0	0	0	0	9,8	23,4	0	0	0	14,0	20,9

Während im allgemeinen 50 ccm des genannten Gelatinegels sich in den Schalen befanden, wurden bei n Salzsäure und n Schwefelsäure

auch Versuche ausgeführt, bei denen die sechsfache Gelmenge, also 300 ccm Gelatinegel sich in den Schalen befanden. Hieraut beziehen sich die zweiten unteren Zahlen in den Spalten 2 und 6 der Tabelle. In den Spalten 13 und 14 bzw. 18 und 19 finden sich die Versuchsergebnisse für 0,5 n Lösungen von Natriumlactat und Natriumformiat, wie von Mischungen der Lösungen dieser Salze mit den betreffenden Säuren.

Die Tabelle I zeigt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen, daß insbesondere Salzsäure, Milchsäure und Ameisensäure stark quellend auf das Gelatinegel wirken, und zwar erweist sich die Geschwindigkeit und Größe der Quellung durch Ameisensäure und Milchsäure fast gleich groß, während die Quellung durch Salzsäure merklich geringer ist. Die Geschwindigkeit der Quellung durch Schwefelsäure ist geringer als durch Salzsäure, namentlich nach 24 Stunden zeigt sich ein erheblicher Unterschied.

Ein Vergleich der Ameisensäurequellung mit der Quellung durch Essigsäure und Buttersäure nach der Arbeit von *Tomita* zeigt, daß Ameisensäure, wie bereits bekannt ist, wesentlich stärker quellend wirkt als Essigsäure und Buttersäure.

Die weiteren Ergebnisse der Tabelle decken sich im wesentlichen mit früheren Feststellungen, so daß nicht weiter darauf eingegangen werden soll.

Die Tabellen II bis V geben nun Auskunft über das Eindringen der gelösten Säuren in das Gel, und Tabelle VI über das Vordringen derselben. Die Tabellen II bis V sind zunächst ohne weiteres verständlich. Spalte 1 enthält die Beobachtungszeiten und die übrigen Spalten enthalten die unter Berücksichtigung der Wasseraufnahme durch das Gel berechneten Gesamtmengen der Säuremole, welche nach den betreffenden Zeiten noch in der vorhandenen Lösungsmenge sowie im Gel vorhanden sind.

Tabelle II.

Zeit	n Salzsäure (30,0 ccm) + Gel (6 × 50 ccm)		n Salzsäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)		n/5 Salzsäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)		n/10 Salzsäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)		n/50 Salzsäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)	
	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel
0'	0,0300	—	0,0300	—	0,0060	—	0,0030	—	0,00059	—
3	0,0196	0,0104	0,0209	0,0091	0,0039	0,0021	0,0019	0,0011	0,00038	0,00021
15	0,0159	0,0141	0,0170	0,0130	0,0026	0,0034	0,0013	0,0017	0,00022	0,00037
30	0,0126	0,0174	0,0130	0,0170	0,0020	0,0040	0,0009	0,0021	0,00011	0,00048
1h	0,0094	0,0206	0,0113	0,0187	0,0016	0,0044	0,0005	0,0025	0,00005	0,00054
2	0,0066	0,0234	0,0093	0,0207	0,0014	0,0046	0,0003	0,0027	0,00004	0,00055
24	0,0005	0,0295	0,0047	0,0253	0,0003	0,0057	—	—	0,00003	0,00056

Tabelle III.

Zeit	n Schwefelsäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 × 6 ccm)		n Schwefelsäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)		n/5 Schwefelsäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)		n/10 Schwefelsäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)	
	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel
0′	0,0300	—	0,0300	—	0,0060	—	0,00300	—
3	0,0206	0,0094	0,0209	0,0091	0,0036	0,0024	0,00189	0,00111
15	0,0167	0,0138	0,0181	0,0119	0,0027	0,0033	0,00146	0,00154
30	0,0139	0,0161	0,0124	0,0176	0,0021	0,0039	0,00097	0,00203
1h	0,0111	0,0189	0,0128	0,0172	0,0016	0,0044	0,00061	0,00239
2	0,0085	0,0115	0,0099	0,0201	0,00030	0,0057	0,00047	0,00253
24	0,00096	0,0290	0,0068	0,0232	0,0002	0,0058	0,00010	0,00290

Tabelle IV.

Zeit	n Milchsäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)		n/2 Milchsäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)		n/5 Milchsäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)		n/10 Milchsäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)		n Milchsäure (15,0 ccm) und n/2 milchsaures Natron (15,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)	
	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel
0′	0,0300	—	0,0150	—	0,0060	—	0,0030	—	0,0150	—
3	0,0230	0,0070	0,0104	0,0046	0,0041	0,0019	0,0020	0,0010	0,0114	0,0036
15	0,0199	0,0101	0,0082	0,0068	0,0032	0,0028	0,0015	0,0015	0,0106	0,0044
30	0,0145	0,0155	0,0068	0,0082	0,0022	0,0038	0,0011	0,0019	0,0087	0,0063
1h	0,0105	0,0195	0,0037	0,0113	0,0015	0,0045	0,0007	0,0023	0,0073	0,0077
2	0,0086	0,0214	0,0015	0,0135	0,0008	0,0052	0,0004	0,0026	0,0020	0,0130
24	—	—	—	—	—	—	—	—	0,0008	0,0142

Tabelle V.

Zeit	n Ameisensäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)		n/2 Ameisensäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)		n/5 Ameisensäure (30,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)		n Ameisensäure (15,0 ccm), n/2 ameisensaur. Natron (15,0 ccm) + Gel (50,0 ccm)	
	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel	Molzahl in der Lösung	Molzahl im Gel
0′	0,0300	—	0,0150	—	0,0060	—	0,0150	—
3	0,0210	0,0090	0,0104	0,0046	0,0041	0,0019	0,0117	0,0033
15	0,0158	0,0142	0,0076	0,0074	0,0029	0,0031	0,0091	0,0059
30	0,0117	0,0183	0,0042	0,0108	0,0022	0,0038	0,0084	0,0066
1h	0,0065	0,0235	0,0036	0,0114	0,0013	0,0047	0,0065	0,0085
2	0,0042	0,0258	0,0017	0,0133	0,0007	0,0053	0,0056	0,0094
24	—	—	—	—	—	—	0,0031	0,0119

Es interessiert uns einmal die Geschwindigkeit, mit welcher die betreffenden Säuren in der Abhängigkeit von der Konzentration und der Gelmenge in das Gel eindringen, ferner vor allem die Verteilung der Säuren in Lösung und Gel, welche nach 24 Stunden statthat.

Tabelle VI.

3 Proz. Gelatine (10,0 ccm) + Säuren (3,0 ccm).
Messungen der Diffusionsgeschwindigkeit in Zentimeter. Reagenzglasversuch.

Zeit	Salzsäure			Schwefelsäure			Milchsäure			Ameisensäure			
	n	n/5	n/10	n	n/5	n/10	n	n/5	n/10	n	n/2	n/5	n/10
	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm	ccm
0'	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
10	0,45	0,35	0,3	0,35	0,3	0,25	0,3	0,25	0,2	0,35	0,3	0,25	0,20
30	0,7	0,6	0,5	0,6	0,5	0,45	0,45	0,4	0,35	0,65	0,55	0,45	0,35
1h	1,0	0,8	0,7	0,8	0,7	0,6	0,6	0,55	0,5	0,85	0,75	0,65	0,55
2	1,4	1,15	1,0	1,15	1,0	0,8	0,85	0,75	0,7	1,15	1,05	0,85	0,70
über 24	5,5	4,0	3,3	4,3	3,35	2,85	3,0	2,6	2,3	3,80	3,30	2,80	2,60

Die Salzsäuretabelle lehrt uns, wenn wir die Ergebnisse dieser Tabelle mit denjenigen der Arbeit von *Tomita* in bezug auf die Säuren Essigsäure und Buttersäure, vgl. daselbst S. 338 bis 341, vergleichen, daß die oberflächeninaktive Salzsäure in den verschiedenen Konzentrationen geschwinder in das Gelatinegel eindringt als die oberflächenaktiven Fettsäuren Essigsäure und Buttersäure, welche nahezu gleich schnell eindringen, und ebenso zeigt sich, daß bei eingetretenem Gleichgewicht nach 24 Stunden mehr Salzsäure als Essigsäure und Buttersäure in das Gel eingetreten sind.

Wenn die Gelmenge (vgl. Spalten 2 und 3) anstatt wie bei den anderen Versuchen 50 ccm — 300 ccm beträgt, so wird nahezu die gesamte Salzsäuremenge vom Gel aufgenommen.

Die Schwefelsäuretabelle führt im wesentlichen zu denselben Ergebnissen. Die Geschwindigkeit des Eindringens ist für Schwefelsäure etwas geringer als für Salzsäure, und nach 24 Stunden sind die in das Gel eingedrungenen Salzsäuremengen etwas größer als für Schwefelsäure.

Die Milchsäure dringt anfangs ein wenig langsamer in das Gel ein als die Salzsäure, aber nach längeren Zeiten ist entsprechend der größeren Wasserquellung auch mehr Milchsäure als Salzsäure in das Gel eingedrungen.

Die Ameisensäure dringt namentlich in den konzentrierteren Lösungen wesentlich schneller in das Gel ein als Salzsäure, und insbesondere auch schneller als Essigsäure und Buttersäure (s. *Tomita*, l. c.).

Endlich sei auf Tabelle VI hingewiesen. Es handelt sich hier um Reagenzglasversuche, durch welche die Geschwindigkeit des Vordringens der verschiedenen Säuren in ein mit einer minimalen Menge Neutralrot versetztes 3 proz. Gelatinegel festgestellt wurde. Die

Reihenfolge der Säuren in bezug auf die Diffusionsgeschwindigkeit war: Salzsäure > Schwefelsäure > Ameisensäure > Milchsäure.

Das wesentlichste Ergebnis dieser Arbeit dürfte in der Feststellung liegen, daß sowohl in bezug auf die Geschwindigkeit des Eintritts von Wasser und in Wasser gelöster Säuren in ein Gelatinegel sowie in bezug auf die im Gleichgewichtszustande eingetretenen Mengen zwischen oberflächenaktiven und oberflächeninaktiven Säuren nicht derjenige Unterschied statthat, den man nach den Versuchen *Overtons* und anderen über das Eindringen oberflächenaktiver Stoffe in Zellen und Zellkomplexen erwarten sollte.

Lipoidtheorie und Oberflächenaktivitätstheorie. II.

Von

J. Traube und S. Yumikura.

(Aus dem Laboratorium von Prof. *J. Traube* an der Technischen Hochschule Charlottenburg.)

(Eingegangen am 18. Februar 1925.)

Die vorhergehenden Mitteilungen des einen von uns (*S. Yumikura*) bilden eine willkommene Ergänzung zu den vor kurzem[1]) in dieser Zeitschrift veröffentlichten Arbeiten von *Tomita* über Adsorption und Osmose in Gelen sowie der daran sich anschließenden Mitteilung von *J. Traube* über Lipoidtheorie und Oberflächenaktivitätstheorie[2]).

Tomita hatte die Adsorption und Osmose in Wasser gelöster oberflächenaktiver Stoffe gegenüber einem 5proz. Gelatinegel verglichen mit der Adsorption und Osmose gegenüber einem gleichkonzentrierten Gelatinegel, welchem 2 Proz. einer fein verteilten Lecithinemulsion beigemengt waren. In der neueren Arbeit des einen von uns (*Yumikura*): Über Osmose in wässerige Gele ohne und mit Lipoidzusatz, wurde indessen die Lipoidmenge variiert. Ein Gelatinegel ohne Lecithin wurde mit Gelen von 2 bzw. 5 bzw. 8 Proz. Lecithin verglichen, und ebenso ein Hühnereiweißgel mit gemischten Gelen aus einem Hühnereiweiß mit einem bzw. zwei bzw. drei Hühnereigelb.

Diese neueren Versuche bestätigen zunächst, in welch hohem Maße bei stark oberflächenaktiven Stoffen, wie Caprylsäure und Octylalkohol, die Adsorptions- und osmotische Geschwindigkeit sowie die Verteilung des Adsorptivs im Gleichgewichtszustand zwischen Gel und wässeriger Lösung von dem Lipoidgehalt der Gele beeinflußt wird.

Die Tabellen I, II und III der erwähnten Arbeit des einen von uns (*Yumikura*) lehren uns, daß in dem 8 Proz. Lecithin haltigen Gelatinegel nach 24 Stunden so gut wie sämtliche Caprylsäure vom Gel aufgenommen wurde, in dem 5 und 2 Proz. Lecithin haltigen Gel war die Aufnahme der Caprylsäure nicht ganz so vollständig, in dem rein

---

[1]) *Tomita*, diese Zeitschr. 153, 335, 1924.
[2]) *J. Traube*, ebendaselbst 153, 358, 1924.

wässerigen Gel war nach 24 Stunden die Verteilung der Caprylsäure zwischen Gel und Wasser etwa wie 2 : 1.

Bei Octylalkohol und den Eiweißgelen wurden analoge Ergebnisse erzielt (vgl. die Tabellen VII, VIII und IX). Das Gel aus einem Hühnereiweiß + drei Eigelb nahm nach 24 Stunden den Octylalkohol so gut wie völlig in sich auf. Das Eiweißgel mit zwei Eigelb adsorbierte den Octylalkohol um ein Geringes weniger, bei dem Gel ein Eiweiß + ein Eigelb waren die Unterschiede schon größer, im reinen Eiweißgel war die Verteilung zwischen Gel und wässeriger Lösung etwa wie 3 : 1.

Auch hier sei nochmals die *Langsamkeit* hervorgehoben, mit welcher selbst derartig starke oberflächenaktive Stoffe, wie Caprylsäure und Octylalkohol, von den Gelen aufgenommen wurden. Von dem wässerigen Gelatinegel war nach 2 Stunden erst etwa die Hälfte der Caprylsäure adsorbiert, und selbst bei dem 8 Proz. Lecithin haltigen Gelatinegel dauerte es nahezu 15 Minuten, bis die halbe Menge der Caprylsäure aufgenommen war.

Die Versuche mit Essigsäure, Buttersäure, i-Amylalkohol (s. die Tabellen IV, V, VI, IX und X) ergaben, daß für diese Stoffe von geringerer Oberflächenaktivität die Geschwindigkeit der Aufnahme in die Gele wesentlich geringer war als für Caprylsäure und Octylalkohol; die Verteilung nach 24 Stunden war so, daß in der Phase der wässerigen Lösung noch erhebliche Mengen der genannten Stoffe enthalten waren auch bei Gegenwart der Lipoide, wie sich überhaupt zeigte, daß der Einfluß der Lipoide zwar vorhanden war, aber derselbe war weniger bedeutend als für Caprylsäure und Octylalkohol. Die Diffusionsgeschwindigkeit der genannten Säuren im Gel (Tabellen V und VI) wurde nur sehr wenig durch Lecithinzusatz beschleunigt. Dieselbe ist für Essigsäure und Buttersäure trotz der großen Unterschiede der Oberflächenaktivität nur wenig verschieden.

Werfen wir nun einen Blick auf die vorhergehende Arbeit des einen von uns (*Yumikura*): über die Osmose einiger Säuren in ein Gelatinegel, so ist vom Standpunkt der hier uns interessierenden Frage die Tatsache besonders beachtenswert, daß die oberflächeninaktive Salzsäure und selbst die langsamer aufgenommene Schwefelsäure von dem wässerigen Gelatinegel schneller und vollkommener aufgenommen werden als die stark oberflächenaktive Caprylsäure oder Buttersäure oder Essigsäure. Fügen wir aber dem Gelatinegel mehr und mehr Lecithin hinzu, so wird die Aufnahme der Mineralsäuren sicherlich nicht günstiger, sondern bei größeren Lipoidmengen ungünstig beeinflußt, dahingegen werden die oberflächenaktiven Stoffe, ganz insbesondere die stark oberflächenaktiven Stoffe, mit stark wachsender Geschwindigkeit und Menge aufgenommen. *Während also in wässerige Gele oberflächeninaktive Stoffe oder schwach oberflächen-*

aktive Stoffe oft mit größerer Geschwindigkeit eindringen und besser vorwärts diffundieren als Stoffe von größter Oberflächenaktivität, die wegen ihres großen Moleküls häufig nur langsam weiter diffundieren, ändern sich die Verhältnisse gründlich, sobald steigende Lipoidmengen vorhanden sind. Dann erst treten alle jene Erscheinungen ein, welche an pflanzlichen und tierischen Zellen, an Muskeln usw. beobachtet wurden, d. h. die Stoffe dringen um so schneller und in um so größerer Menge in die Gele oder Zellen ein, je oberflächenaktiver bzw. je lipoidlöslicher sie sind, und hier kommen wir nun auf die wesentlichste Ursache, weshalb beide Theorien, sich gegenseitig ergänzend, im allgemeinen Gültigkeit haben. Die Oberflächenaktivität geht im allgemeinen, wenn auch keineswegs immer, wie der eine von uns (Traube) stets hervorhob, der Lipoidlöslichkeit parallel, die geringe Haftintensität am Wasser bedingt meist eine große Haftintensität an Lipoiden.

Wir wollen nicht vergessen, darauf hinzuweisen, daß die Geschwindigkeit der Adsorption und Osmose in Wasser gelöster Stoffe in Gele und der Grad der Aufnahmefähigkeit in erster Linie auch abhängt von dem durch die Lösungen hervorgebrachten Quellungsgrad der Gele.

Auch in dieser Beziehung haben die vorhergehenden drei Arbeiten (*Yumikura*) zu beachtenswerten Ergebnissen geführt. Insbesondere sei hier hingewiesen auf die Tabellen der Arbeit: Über Osmose einiger Anästhetika in wässerige und lipoidhaltige Gele. Obwohl es sich hier namentlich bei Alkalizusatz um die Adsorption und Osmose stark oberflächenaktiver Basen (Cocain, Alypin usw.) handelt, sind doch nach 24 und 48 Stunden nach eingetretenem Gleichgewichtszustand noch bedeutende Alkaloidmengen in der Phase der wässerigen Lösung geblieben, weit größer als bei den Säuren, insbesondere Mineralsäuren, weil die zum Teil sehr starken Säurequellungen bei den Alkaloidversuchen in Wegfall kommen. Auch in der Alkaloidarbeit zeigte sich, daß bei den besonders oberflächenaktiven Alkaloiden, wie Cocain, Alypin und anderen, ein wesentlich größerer Einfluß eines Lecithingehalts des Gelatinegels auf die aufgenommene Alkaloidmenge festgestellt werden konnte als für ein weniger oberflächenaktives Alkaloid, wie Novocain.

Die von dem einen von uns (*Traube*) begründete Oberflächenaktivitätstheorie ist von der Mehrzahl der maßgebenden Forscher gegenüber der Lipoidtheorie bevorzugt worden, auch hat dieselbe ja sogar eine gewisse quantitative Bestätigung erhalten durch die bekannte Regel für homologe Reihen sowie die Versuche von *Czapek*, *Kisch* u. a.

Höber, welcher sich lange Zeit gegen die Oberflächenaktivitätstheorie ablehnend verhielt, stellt in der neuesten Auflage (1924) seines vortrefflichen Lehrbuchs: Physikalische Chemie der Zelle und der Gewebe, die beiden Theorien koordiniert nebeneinander.

Höber hatte gewiß nicht Unrecht, die Lipoidtheorie nicht fallen zu lassen, wenn auch seine Argumentation nach mancher Richtung angreifbar erscheint. So können wir das Bedenken *Höbers* (S. 507ff.) nicht teilen, welches derselbe zuungunsten der Oberflächenaktivitätstheorie geltend macht, indem er darauf hinweist, daß die gegen Luft gemessene Oberflächenspannung von Lösungen nicht den Oberflächenspannungen an Grenzflächen zweier Flüssigkeiten zu entsprechen brauchen. Dieses Bedenken erscheint uns unberechtigt zu sein. Je oberflächenaktiver ein Stoff in bezug auf die Grenzfläche Wasser/Luft ist, je mehr derselbe sich nach *Gibbs* an jener Grenzfläche anreichert, um so größer wird auch im allgemeinen seine Konzentration etwa an der Grenzfläche Wasser/Öl sein, denn die mehr oder weniger große Konzentrierung in der Grenzfläche hängt in erster Linie von der Haftintensität (Haftdruck) an der wässerigen Phase ab.

Der Übergang in die Grenzschicht bedeutet aber nur eine Chance für die Adsorption von seiten der zweiten Phase. Hier entscheidet eine zweite Haftintensität, etwa die Haftintensität zum Lipoid usw., und diese Haftintensität entzieht sich meist unseren Messungsmöglichkeiten. *Traube* und *Klein*[1]) haben gelegentlich durch ultramikroskopische Beobachtungen festgestellt, daß oberflächenaktive submikronische Teilchen von Octylalkohol, Caprylsäure usw. sich an der Grenzfläche Wasser/Öl in hohem Maße konzentrieren. Die Teilchen behalten aber noch nach Tagen ihre lebhafte *Brown*sche Bewegung, nicht ein einziges Teilchen wird von der Öloberfläche adsorbiert. Eine Adsorption in der wässerigen Grenzfläche bedeutet noch keine Adsorption an der Grenzfläche der zweiten Phase. Diese Auffassung sei den Ausführungen *Höbers* (S. 507 und 508 sowie S. 169) entgegengehalten[2]).

Höber bezeichnet die Oberflächenaktivitätstheorie (Haftdrucktheorie) als Adsorptionstheorie der Permeabilität. Diese Namens-

---

[1]) *Traube* und *Klein*, Kolloid-Zeitschr. **29**, 236, 1921.

[2]) Die Bemerkungen *Höbers* auf S. 508 in bezug auf die gute Adsorbierbarkeit von Traubenzucker an Tierkohle trotz seiner Oberflächeninaktivität ist daher kein die Oberflächenaktivitätstheorie belastendes Argument, ebenso sind die weiteren Bemerkungen auf derselben Seite über die Adsorption von Farbstoffen, ferner der drei Oxybenzoesäuren, wie uns scheint, nicht richtig. Lösungen von Natriumsalicylat haben eine *wesentlich* geringere Oberflächenspannung als die Natriumsalzlösungen der isomeren Oxybenzoesäuren. Den Oberflächenaktivitäten der Salzlösungen gehen aber die Oberflächenaktivitäten der freien Säuren parallel. In Anbetracht der geringeren Wasserlöslichkeit der Salicylsäure ist an die Submikronenbildung zu denken (vgl. *Traube* und *Klein*, l. c.). Auf die Ausführungen *Höbers*, S. 514 seines Werkes, soll hier nicht eingegangen werden, aber dieselben erscheinen uns nicht berechtigt.

umtaufe dürfte sehr unzweckmäßig sein, man kann mit demselben Rechte auch die Lipoidtheorie als Adsorptionstheorie bezeichnen.

Gelegentlich eines Vortrags des einen von uns (*Traube*) über die hier behandelten Fragen wurde von sachverständiger Seite geäußert: zwei Theorien könnten doch nicht richtig sein. Hierzu sei bemerkt, daß die beiden Theorien ja gleichsam zu einer einzigen verschmelzen durch die Beziehungen, welche zwischen Oberflächenaktivität und Lipoidlöslichkeit zwar nicht allgemein, aber im großen und ganzen bestehen. Die Oberflächenaktivitätstheorie ist ja sicherlich die allgemeinere, indem sie einen viel größeren Komplex von Tatsachen umfaßt, denn es bestehen nicht nur die Beziehungen von Oberflächenaktivität und Lipoidlöslichkeit, sondern von Oberflächenaktivität zur Löslichkeit und Löslichkeitsbeeinflussung ganz allgemein, zur Adsorption, zum Dampfdruck, zu katalytischen Vorgängen usw., und es ist ganz besonders darauf hinzuweisen, daß auch für nicht lipoidlösliche Stoffe, wie anorganische Salze, Zuckerarten, Glycerin, Glykokoll usw. die Fähigkeit der Adsorption und des Eindringens in Zellen dem Einfluß auf die Oberflächenspannung des Wassers parallel gehen. Die Beziehungen aber, welche sich bei Versuchen an Pflanzenzellen, Blutkörperchen, Muskeln usw. in bezug auf das Eindringen der Stoffe und ihre Oberflächenaktivität ergeben haben, wären wohl nie gefunden worden, wenn die Zellen nicht lipoidhaltig wären.

Anmerkung: In der ersten Arbeit über Lipoidtheorie und Oberflächenaktivitätstheorie, diese Zeitschr. **153**, 358, 1924, findet sich in der zweitletzten Zeile der Anmerkung auf S. 361 ein sinnentstellender Druckfehler. Es muß heißen anstatt dissoziieren — diosmieren.

Über Eisen- und Blutfarbstoffbestimmungen in normalen Geweben und in Tumorgewebe.

Von

Muneo Yabusoe.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 21. Februar 1925.)

Ich habe auf Vorschlag von Herrn *Otto Warburg* den Eisengehalt tierischer Zellen bestimmt und als Versuchsmaterial sowohl normale Organe von Ratten, als auch das *Flexner-Jobling*sche Rattencarcinom benutzt.

Methodisch bestand meine Aufgabe darin, das gesamte Eisen in den Organen zu messen und davon das Blutfarbstoffeisen abzuziehen. Das gesamte Eisen bestimmte ich in der Organasche kolorimetrisch[1]) nach *Lachs* und *Friedenthal*, das Blutfarbstoffeisen als Hämin in methylalkoholischer Lösung mit Hilfe des *König-Martens*schen Spektralphotometers[2]).

Das Verfahren, das ich angewandt habe, ist keine Präzisionsmessung, aber geeignet, in einfacher Weise die Größenordnung des in den Zellen vorkommenden Eisens zu ermitteln.

I. Bestimmung des Gesamteisens.

Die Organe wurden mit vernickelten, mit Sodalösung befeuchteten Instrumenten präpariert, wobei die größeren Gefäße nach Möglichkeit entfernt wurden. Das *Flexner-Jobling*sche Rattencarcinom wurde von seiner blutreichen Kapsel befreit. Stücke wurden aus dem Innern des Tumors herausgeschnitten, die weder nekrotisch noch reich an Bindegewebe waren. Derartige Stücke sind bei einiger Übung an ihrer blaustichigen Farbe leicht von bindegewebsreichen weißlichen Teilen und den gelbstichigen nekrotischen Teilen zu unterscheiden.

50 bis 200 mg feuchter Organe wurden in einem gewogenen Porzellantiegel bei 100° bis zur Konstanz getrocknet, gewogen, ver-

---

1) Diese Zeitschr. **32**, 130, 1911.

2) *F. F. Martens* und *F. Grünbaum*, Ann. d. Phys. 4. Folge, **12**, 984, 1905.

kohlt, geglüht, mit einem Tropfen eisenfreier Salzsäure[1]) und einem Körnchen Kaliumchlorat versetzt und zur Trockne verdampft. Dann wurde der Tiegel mit 1 ccm sechsfach n Salzsäure, 1 ccm Wasser und 1 ccm 10proz. Rhodankalilösung ausgespült. Die Spülflüssigkeiten wurden in einem Reagenzröhrchen vereinigt, ihre Färbungen in bekannter Weise mit Färbungen verglichen, die durch Verdünnen der *Fresenius*schen Eisenlösung erzeugt waren. $^1/_{1000}$ mg Eisen konnte auf diese Weise noch bestimmt werden, und wählte man die Organmengen so, daß etwa $^1/_{100}$ mg Eisen zur Bestimmung kam, so betrug der Fehler etwa 20 Proz., eine für meine Zwecke ausreichende Genauigkeit.

II. Bestimmung des Blutfarbstoffeisens.

Zur Bestimmung des Blutfarbstoffeisens wurden größere Organmengen, etwa je 1 g feuchten Gewebes, benutzt. Das Gewebe wurde mit Sand zerrieben, mit 1 ccm n Salzsäure versetzt, so daß die Reaktion kongosauer wurde, und mit 8 ccm absoluten Methylalkohols verrührt. Dann wurde zentrifugiert, mit 8 ccm Methylalkohol durchgemischt und wieder zentrifugiert. Die vereinigten, beim Zentrifugieren gewonnenen überstehenden Flüssigkeiten wurden mit 1 g fein gepulverten Magnesiumsulfats ($MgSO_4 + 7\,H_2O$) 5 Minuten geschüttelt und darauf so lange zentrifugiert, bis die überstehende Flüssigkeit vollkommen klar war, die schließlich in einen Meßkolben gebracht und hier auf 20 ccm mit salzsäurehaltigem Methylalkohol (15 Teile absoluten Methylalkohols, 1 ccm n Salzsäure, 1 ccm Wasser) aufgefüllt wurde. Durch diese Behandlung wurde das Hämin aus dem Blutfarbstoffmolekül abgelöst und in eine klare, photometrierbare Lösung übergeführt.

Für die photometrische Messung benutzte ich eine mittlere Wellenlänge von 635 $\mu\mu$, eine Schichtdicke der Häminlösung von 2 cm.

Die Standard-Häminlösung enthielt 10 mg Hämin auf 100 ccm und war hergestellt durch Auflösen von 10 mg Hämin in 1 ccm n/10 Natronlauge, Zugabe von 50 ccm Methylalkohol, 2 ccm n Salzsäure und Auffüllen auf 100 ccm mit Methylalkohol. Bezeichnen wir die Häminkonzentration mit c und drücken sie in Milligramm/Kubikzentimeter aus, so war die Konzentration der Standard-Häminlösung 0,1. Diese Lösung gab im *König-Martens*schen Photometer für eine Schichtdicke von 2 cm die Winkel

$$\varphi_1 = 64{,}6^0 \qquad \varphi_2 = 17{,}7^0$$

und die mit Methylalkohol auf das Zehnfache verdünnte Standardlösung

$$\varphi_1 = 41{,}9^0 \qquad \varphi_2 = 36{,}7^0$$

[1]) *S. Sakuma*, diese Zeitschr. **142**, 68, 1923.

Der Absorptionskoeffizient α einer Lösung von der Häminkonzentration 1 berechnet sich nach der Gleichung

$$i = i_0 e^{-\alpha c d}$$

(i_0 auffallende Intensität, i austretende Intensität, c Konzentration der Häminlösung, d Schichtdicke der Häminlösung, e Basis der natürlichen Logarithmen), oder, da

$$ln \frac{i_0}{i} = ln \frac{tg\,\varphi_1}{tg\,\varphi_2},$$

$$\alpha = \frac{1}{d} \cdot \frac{1}{c} \cdot ln \frac{tg\,\varphi_1}{tg\,\varphi_2}.$$

Drücken wir d in Zentimetern aus, so ergibt sich aus den angeführten Winkeln φ_1 und φ_2

α bei der Häminkonzentration 0,1 9,43
α „ „ „ 0,01 . . . . 9,31.

Es ist also α in dem geprüften Konzentrationsbereich nahezu von der Häminkonzentration unabhängig, so daß wir setzen können:

$$c = \frac{1}{d} \cdot \frac{1}{9{,}35} \cdot ln \frac{tg\,\varphi_1}{tg\,\varphi_2}.$$

Der Fehler bei der Bestimmung von α hängt von der Konzentration der Häminlösung ab. Für sehr verdünnte Häminlösungen beträgt der Fehler bei der Winkelmessung einige zehntel Grade, so daß die kleinste Häminkonzentration, die noch erkannt werden kann, von der Größenordnung 10^{-3} mg/ccm ist.

III. Blutfarbstoffeisen in nichtgespülten Organen.

Zunächst habe ich festgestellt, wieviel Blutfarbstoffeisen man in den Organen findet, wenn man die Tiere tötet, ohne das Blut aus den Gefäßen auszuspülen. Ich tötete die Tiere auf verschiedene, in Tabelle I angegebene Weise und erhielt die in Tabelle I eingetragenen Werte.

Aus der Tabelle ergibt sich, daß wir pro Gramm trockenen Gewebes an Blutfarbstoffeisen im Mittel finden:

in dem *Flexner-Jobling*schen Rattencarcinom . .	0,005 mg
im Hoden	0,015 „
„ Muskel	0,015 „
in Leber	0,41 „
„ Niere	0,27 „

und daß die Todesart der Tiere an der Größenordnung dieser Zahlen nichts ändert. Die Werte für den Tumor liegen innerhalb der Fehlergrenzen einer Einzelbestimmung, sind aber doch — wenn auch mit

Tabelle I.

Ratte, getötet durch	Gewebeart	Trocken-gewicht mg	Abgelesene Winkel Schichtdicke 2 cm φ_1	φ_2	Hämin-Fe pro 1000 mg Trocken-substanz mg × 10³
Nackenschlag	Tumor	200	39,7°	39,4°	4,8
„	„	220	38,0	37,7	4,5
„	„	180	37,3	37,0	5,5
„	„	240	37,9	37,6	4,1
Erstickung	„	200	37,6	37,4	3,3
„	„	200	37,6	37,3	4,6
„	„	126	37,7	37,5	5,2
„	„	232	37,9	37,5	5,6
„	„	170	37,8	37,6	3,8
„	„	208	37,8	37,5	4,7
„	„	208	37,9	37,2	11
Chloroform	„	130	35,65	35,45	5,1
Blausäure (0,5 ccm n/10 HCN subkutan)	„	180	38,5	38,0	8,0
Amylnitrit	„	184	38,5	38,0	8,9
Nackenschlag	Hoden	320	38,7	38,0	7,1
„	„	122	37,5	37,0	13
„	„	250	38,1	37,1	13
„	„	156	38,3	37,0	27
Erstickung	„	304	38,0	37,0	11
„	„	328	38,0	36,9	11
„	„	180	38,5	37,25	17
„	„	220	37,9	36,7	18
„	„	316	38,3	37,1	12
„	„	200	39,3	36,8	41
Chloroform	„	400	38,95	37,4	13
Blausäure (0,5 ccm n/10 HCN subkutan)	„	400	39,0	38,4	5
Amylnitrit	„	156	38,9	38,5	8
Nackenschlag	Oberschenkel-muskel	240	39,0	38,0	13
„	„	150	35,9	35,85	12
„	„	176	38,0	37,5	9
„	„	226	37,7	37,0	10
„	„	204	38,1	37,0	28
Erstickung	„	200	38,7	38,5	3 (?)
„	„	216	37,8	37,0	12
„	„	154	38,5	37,5	21
„	„	162	38,5	37,9	12
„	„	224	38,1	37,0	16
„	„	202	38,3	37,2	18
„	„	152	38,2	37,0	26
„	„	210	37,9	37,0	14
Blausäure (0,5 ccm n/10 HCN subkutan)	„	104	38,9	38,5	13
Nackenschlag	Leber	224	43,3	32,5	160
„	„	244	46,5	28,7	246
„	„	232	43,6	32,1	173

Tabelle I. (Fortsetzung.)

Ratte, getötet durch	Gewebeart	Trockengewicht mg	Abgelesene Winkel Schichtdicke 2 cm φ_1	φ_2	Hämin-Fe pro 1000 mg Trockensubstanz mg × 10^{-3}
Erstickung	Leber	240	51,5°	25,0°	375
"	"	222	57,0	21,0	560
"	"	234	56,2	21,4	540
"	"	260	60,1	19,3	560
"	"	214	58,1	20,3	650
"	"	208	57,2	22,0	580
Amylnitrit	"	200	45,0	31,0	230
Nackenschlag	Niere	138	43,8	32,0	290
"	"	142	41,3	34,0	170
"	"	144	41,0	33,9	164
Erstickung	"	174	46,5	29,0	330
"	"	144	45,3	30,8	330
"	"	202	51,3	27,0	300
Amylnitrit	"	110	43,25	32,25	340

großen Fehlern — reell, da der Unterschied der abgelesenen Winkel immer gleichsinnig ist. Die Tatsache, daß der Tumor die geringsten Blutfarbstoffwerte liefert, stimmt zu seinem fast weißen Aussehen und spricht für eine schlechte Versorgung des Tumors mit Blut. „Blutig" sind nach unseren Erfahrungen immer nur die nekrotischen Teile der Tumoren.

IV. Blutfarbstoffeisen in gespülten Organen.

Weiterhin habe ich untersucht, wieweit man den Blutfarbstoff aus den Organen entfernen kann, wenn man die Tiere vom Herzen aus mit Ringerlösung spült.

Ich tötete die Ratten durch Nackenschlag, öffnete sofort den Thorax und führte eine Kanüle durch die Herzspitze in den linken Ventrikel ein. Dann klemmte ich die Vena cava oberhalb des Diaphragmas ab, durchschnitt sie distal und ließ — unter einem Drucke von 1 m Ringerlösung — die körperwarme Spülflüssigkeit in das schlagende Herz einfließen, bis sie farblos durch den Cavastumpf ausfloß. Für die blutreichsten Organe — Leber und Niere — erhielt ich nach der Spülung die in Tabelle II verzeichneten Werte.

Tabelle II.

Organ	Trockengewicht mg	Abgelesene Winkel Schichtdicke 2 cm φ_1	φ_2	Hämin-Eisen pro 1000 mg Trockensubstanz mg × 10^{-3}
Leber, gespült . . .	200	40,5 °	36,5 °	64
	200	40,25	36,25	65
Niere, gespült . . .	64	39,8	38,0	90
	64	39,2	37,8	72

Der Mittelwert des Blutfarbstoffeisens in nicht gespülten Organen ist nach Tabelle I für Niere 0,27 und für Leber 0,41 mg Fe pro Gramm Organ, er sinkt durch die Spülung für Niere auf 0,08 und für Leber auf 0,07 mg. Daß es nicht gelingt, diese Organe frei von Hämin zu erhalten, beruht wahrscheinlich darauf, daß die Zellen selbst Blutfarbstoff oder Derivate desselben enthalten.

V. Gesamteisen in gespülten Organen.

Tabelle III enthält das Ergebnis meiner Gesamteisenbestimmungen, die durchweg mit Organen gespülter Tiere ausgeführt sind.

Tabelle III.

Organ	Zur Bestimmung verwendet (Trockensubstanz) mg	Fe gefunden $mg \times 10^3$	mg Fe pro 1000 mg	Organ	Zur Bestimmung verwendet (Trockensubstanz) mg	Fe gefunden $mg \times 10^3$	mg Fe pro 1000 mg
Tumor	22,7	10	0,46	Niere	25,9	13	0,5
„	14,6	6	0,43	„	24,1	14	0,58
„	44,3	7	0,16	Hoden	11,3	7	0,64
„	43,9	12	0,27	„	13,5	7	0,52
„	17,3	6,5	0,37	„	15,4	6	0,4
„	29,0	8	0,28	„	23,5	8	0,34
Leber	19	10	0,53	„	22,9	8	0,35
„	8,8	4,5	0,51	„	22,5	18	0,8
„	9,7	6	0,62	„	19,8	12	0,65
„	8,0	6	0,75	Muskel	44,6	6	0,14
„	17,6	8	0,46	(Oberschenkel)			
„	16,4	10	0,61	„	20,4	3	0,15
„	18,8	5	0,27	„	22,2	4	0,18
„	20,7	6	0,29	Netzhaut	10,6	3	0,28
„	22,4	12	0,54	(Kaninchen)			
„	30	15	0,5	„	16,7	5	0,30
„	22,1	15	0,68	Fascie	58,7	2,5	0,043
„	33,7	21	0,63	„	38,9	2,0	0,05
Niere	24,1	12	0,5	„	39,0	2,5	0,06
„	8,6	5	0,58	„	21	1,0	0,05
„	19,6	12	0,61	„	83,8	2,0	0,02
„	13,7	4,5	0,37	„	59,2	2,0	0,03
„	17,5	8	0,46	Fibroma	8,4	4	0,05
„	14,1	5,5	0,39	(Mammae, Mensch)			
„	13,0	3	0,23	„	7,2	3	0,04

Aus den Zahlen der Tabelle berechnen sich folgende Mittelwerte an Gesamteisen pro Gramm trockener Substanz:

	mg Fe pro g trockener Substanz
Tumor	0,32
Hoden	0,53
Leber	0,53
Niere	0,47
Netzhaut	0,29
Muskel	0,16
Fascie	0,04

Das Blutfarbstoffeisen im nicht gespülten Tumor beträgt pro Gramm im Mittel 0,005 mg, im nicht gespülten Hoden und Muskel 0,015 mg, kommt also ohne Spülung und noch weniger *nach* Spülung gegenüber dem Gesamteisen in Betracht. Für Leber und Niere müssen wir 0,07 und 0,08 mg für das Hämineisen der gespülten Organe abziehen, so daß wir erhalten:

	mg Fe pro g Trockensubstanz abzüglich des Blutfarbstoffeisens
Tumor	0,32
Hoden	0,58
Leber	0,46
Niere	0,40
Muskel	0,16

Aus den Zahlen der Tabelle ergibt sich, daß die epithelialen Organe und der Tumor einige zehntel Milligramm Eisen pro Gramm Trockensubstanz enthalten. Weniger Eisen enthält der Muskel.

Wie groß die in den Organen gefundenen Eisenmengen sind, machen wir uns am besten klar, indem wir mit ihnen den Eisengehalt des Blutes vergleichen. 1 ccm Rattenblut liefert nach *Barcrofts* Ferricyanidmethode etwa 170 cmm Sauerstoff, entsprechend 0,43 mg Blutfarbstoffeisen. 1 g trockener Blutsubstanz enthält demnach rund 2 mg Eisen oder nur vier- bis sechsmal mehr als die genannten epithelialen Organe *abzüglich* ihres Blutfarbstoffeisens. Die Zelle enthält also nicht, wie man oft sagt, Spuren, sondern sehr erhebliche Mengen Eisen.

Der Eisengehalt des Bindegewebes (vgl. die Fascienwerte der Tabelle) ist klein und bei dem von mir geübten Verfahren nur eben nachweisbar. Es sei bemerkt, daß auch die Atmung der Fascie so klein ist, daß sie mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden mit Sicherheit nicht gemessen werden kann.

Hervorheben möchte ich die Tatsache, daß sich der Tumor in bezug auf seinen Eisengehalt von dem geprüften normalen Epithel etwas, aber nicht erheblich unterscheidet. Gegenteilige Angaben der Literatur haben wenig Wert, weil der Gehalt der Tumoren an Bindegewebe nicht berücksichtigt worden ist. Da sowohl ausgewachsenes wie junges (vgl. die Fibromwerte der Tabelle III) Bindegewebe im Vergleich zum Epithel nur wenig Eisen enthält, so wird man in bindegewebsreichen Tumoren — wie es die menschlichen Carcinome vielfach sind — weniger Eisen finden als in epithelialen Drüsen, ohne daraus einen Schluß auf den Eisengehalt der Krebszelle ziehen zu dürfen.

VI. Eisengehalt von Samen.

Anhangsweise erwähne ich noch, daß ich auch Eisenbestimmungen in Samen ausgeführt habe. Ich wählte als Versuchsmaterial die als eisenarm bekannten Buchweizensamen, ließ sie 2 Tage auf eisenfreiem Filtrierpapier, das mit eisenfreiem Wasser befeuchtet war, quellen, entfernte dann die Samenschalen und bestimmte das Eisen wie in den tierischen Organen. Beispielsweise fand ich in zehn gekeimten Samen bei einem Trockengewicht von 153 mg $^1/_{100}$ mg Eisen, das ist 0,066 mg Eisen pro Gramm trockener Zellsubstanz.

Samen derselben Zucht und desselben Keimalters verbrauchten pro Milligramm Trockensubstanz und Stunde bei 20° 0,5 cmm Sauerstoff in der Atmung.

Der Einfluß des Insulins auf den Zuckerumsatz der herausgeschnittenen Rattenleber. I.

Von

Friedrich Bernhard.

(Aus dem Laboratorium der städtischen Krankenanstalten in Mannheim.)

(Eingegangen am 25. Februar 1925.)

Mit 5 Abbildungen im Text.

Die in folgendem beschriebenen Versuche wurden angestellt, um festzustellen, ob das Insulin einen Einfluß auf den Zuckerstoffwechsel der herausgeschnittenen Warmblüterleber hat. Zu diesem Zwecke wurden Rattenlebern mit Ringer- oder Tyrodelösung durchspült[1]) mit und ohne Zusatz von Glucose und von Insulin zur Durchströmungsflüssigkeit.

A. Methodik.

Die Ratten, deren Lebern verwendet wurden, waren mit Brot und Milch gefüttert. Die Tiere wurden durch Entblutung getötet. Nach Öffnung der Bauchhöhle wurde eine 0,75 ccm fassende Kanüle in die Vena portae eingebunden. Zur Verhinderung der Blutgerinnung war die Kanüle zuvor mit einer 38° C warmen Lösung gefüllt, die aus gleichen Teilen n/2 Na oxal. und 0,9 proz. NaCl bestand. Nach Unterbindung der Vena cava inferior in Nebennierenhöhe konnte die Leber durch Durchtrennung ihrer Aufhängebänder bequem isoliert und ihre Lappen auf einer Glasplatte wieder in die in der Bauchhöhle eingenommene Lage zurückgebracht werden. Die Kanüle wurde hierauf an das Durchspülungsgefäß angeschlossen und die Durchspülung begonnen. Das Durchspülungsgefäß, die Glasplatte, auf der die Leber lag, und der Meßzylinder, in welchen die aus der Leber austretende Flüssigkeit durch Schrägstellung der Glasplatte tropfte, waren sämtlich vorgewärmt und standen bei 38° C in einem großen Luftthermostaten, dessen Luftraum mit Wasserdampf gesättigt war. In die Vena hepatica wurde, um die Präparationszeit abzukürzen, keine Kanüle eingebunden.

Die Zusammensetzung der Durchspülungsflüssigkeit wird bei den einzelnen Versuchsreihen angegeben. Die Durchspülungsflüssigkeit wurde

---

[1]) Literatur über Durchspülung herausgeschnittener Lebern siehe *E. J. Lesser*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **16**, 279, 1919; über Versuche mit Insulin: *derselbe*, Innere Sekretion d. Pankreas. Jena, G. Fischer, 1924. Oppenheimers Handb. d. Biochem. 2. Aufl., **9**, B. I (im Druck).

vor der Durchströmung im Durchspülungsgefäß auf 38° C erwärmt und im Thermostaten, vor Beginn des Versuchs, durch Durchleitung von Sauerstoff mit diesem Element gesättigt. Die Durchströmungsflüssigkeit wurde während des Versuchs in der gleichen Weise mit Sauerstoff gesättigt gehalten, wie es *Lesser*[1]) früher für die Froschleberdurchspülung beschrieben hat. Diese Vorrichtung gestattete auch, die Durchflußgeschwindigkeit durch die Leber konstant zu erhalten. Sie betrug 50 ccm pro ½ Stunde. Die aus der Leber ausgetretene Flüssigkeit wurde alle halbe Stunde abgegrenzt. Da die Durchspülung sich auf 2½ Stunden erstreckte, müssen fünf Perioden unterschieden werden. Die Durchströmungsflüssigkeit jeder Periode wurde auf ihren Gehalt an reduzierender Substanz nach der *Bertrand*schen Methode untersucht, nach vorheriger Enteiweißung durch Quecksilberacetat, Entquecksilbern durch Schwefelwasserstoff und Verjagen desselben durch Durchlüftung.

Die Durchspülungszeit der ersten Periode betrug nicht ganz 30 Minuten, da als Beginn der ersten Periode die Tötung des Tieres angenommen wurde. Die Präparationszeit der Leber betrug durchschnittlich 11 Minuten. Die Zeitdauer der eigentlichen Durchspülung in der ersten Periode beläuft sich demnach auf 19 Minuten. Die Durchspülungsmenge betrug jedoch ebenso wie die aller anderen Perioden 50 ccm. Jn der ersten Periode passierte dadurch eine größere Flüssigkeitsmenge in der Zeiteinheit die Leber, was ein rascheres und gründlicheres Eintreten der Blutfreiheit des Organs bewirkte.

Um zu ermitteln, ob die bei zuckerfreier Durchströmungsflüssigkeit an die Durchströmungsflüssigkeit abgegebene reduzierende Substanz aus Glykogen entsteht, mußte der Glykogengehalt der Leber zu Beginn und am Schluß der Durchspülung unter Berücksichtigung der jeweils in der Leber herrschenden Zuckerkonzentration bestimmt werden. Beide Bestimmungen wurden in dem gleichen Leberlappen nebeneinander vorgenommen. Zu diesem Zwecke wurde am Ende der ersten Periode ein Leberlappen abgebunden, möglichst rasch, nach Feststellung seines Gewichts, in einer Reibschale unter eisgekühltem 96 proz. Alkohol fein zerrieben und in ein etwa 100 ccm fassendes Zentrifugierglas unter weiterem Zusatz eisgekühlten Alkohols quantitativ übergeführt. Es wurde scharf zentrifugiert, der Alkohol quantitativ, unter zweimaligem Nachwaschen mit 96 proz. Alkohol auf der Zentrifuge, in eine Glasschale übergeführt und vorsichtig auf dem Wasserbade zur Trockne gebracht. Der Rückstand wurde in Wasser gelöst und in ein 50 ccm enthaltendes Meßkölbchen quantitativ übergespült. Zur Enteiweißung genügten 3 bis 6 g Quecksilberacetat und 1 bis 2 g Kochsalz, letzteres um ein leichteres Entquecksilbern durch Schwefelwasserstoff zu erzielen. Nach Verjagen des Schwefelwasserstoffs durch Durchlüftung wurde in möglichst viel Filtrat (25 bis 35 ccm) der Gehalt an reduzierender Substanz nach *Bertrand* bestimmt und auf 100 g Leber umgerechnet.

In dem alkoholunlöslichen Rückstand, der im Zentrifugierglas verblieben war, wurde das Glykogen nach *Pflüger* bestimmt. Statt zu Filtrieren, wurde stets zentrifugiert und die ganze Bestimmung (abgesehen von der Zuckertitration) in dem nämlichen Gefäß durchgeführt.

---

[1]) *Lesser*, diese Zeitschr. **119**, 108, 1921.

Der am Schluß der Durchspülung entnommene zweite Leberlappen wog, wie der erste, durchschnittlich 1 bis 2 g. Er wurde ebenso wie der erste Leberlappen behandelt. Sämtliche erhaltenen Werte — Glykogengehalt der Leber, Zuckerkonzentration der Leber und Zuckergewinn oder -verlust der Durchströmungsflüssigkeit in jeder Periode — wurden auf 100 g Leber umgerechnet.

B. Versuche.

1. Versuchsreihe.

Bei den ersten Versuchen gelangte zuckerfreie Durchspülungsflüssigkeit zur Verwendung, die sich aus 0,85 Proz. NaCl, 0,01 Proz. KCl, 0,01 Proz. $CaCl_2$ und 0,01 Proz. $NaHCO_3$ zusammensetzte. Tabelle I zeigt die auf 100 g Leber umgerechnete Zuckerabgabe in Milligrammen in den verschiedenen Perioden, ferner den Glykogengehalt, die Zuckerkonzentration der Leber und die Zuckerbilanz, alles in Milligrammen pro 100 g Leber berechnet.

Tabelle I a.

	mg Zucker in der Durchströmungsflüssigkeit					Zuckerabgabe der
Periode	1	2	3	4	5	Perioden 2 bis 5
Versuch 3	2365	808	588	250	183	1829
„ 5	1393	540	100	51	40	731
„ 6	1563	951	234	108	72	1365
Mittel	1774	766	307	136	98	1308

Tabelle I b.

	Leberglykogen		Zuckerkonzentration	
	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5
Versuch 3	1710	150	460	130
„ 5	520	40	300	80
„ 6	590	0	520	70
Mittel	940	60	427	93

Tabelle I c.

	Leberglykogen- und Leberzuckerabnahme in Periode 2 bis 5	Zucker in der Durchspülungsflüssigkeit in Periode 2 bis 5	Bilanz
Versuch 3	1890	1829	— 61
„ 5	700	731	+ 31
„ 6	1040	1365	+ 325
Mittel	1210	1308	+ 98

Es entsteht die Frage, ob der in der Durchströmungsflüssigkeit nachgewiesene Zucker nur aus der Abnahme des Leberglykogens und Leberzuckers stammt oder ob Gluconeogonie stattgefunden hat. Im dritten Teile (c) der Tabelle I ist für jeden Versuch die Summe der Abnahme des Leberglykogens und Leberzuckers mit dem in der Durchspülungsflüssigkeit erschienenen Traubenzucker verglichen. Die Leberglykogen- und Leberzuckerabnahme entspricht im Mittelwert dieser Versuche der Glucoseabgabe an die Durchspülungsflüssigkeit. Wie in dem Mittelwert, liegt auch in den Einzelversuchen die Differenz zwischen der Summe der Glykogen- und Zuckerabnahme der Leber einerseits und der Zuckerabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit andererseits, zweimal innerhalb der Fehlergrenzen der angewandten Methodik und einmal außerhalb derselben (Versuch 6). Trotzdem möchte ich die Glucoseabgabe auch in diesem Einzelversuch nicht auf Gluconeogonie beziehen, weil neben Glykogen und Zucker noch Dextrine in der Leber vorkommen können, durch die das Plus der Glucoseabgabe verursacht sein kann. Bei der Berechnung der Zuckerabgabe konnten natürlich nur die Perioden 2 bis 5 für die Zuckerbilanz berücksichtigt werden. Das Ergebnis der Versuche stimmt mit der Feststellung *Iwanoffs*[1]) überein, der an der Kaninchenleber zeigte, daß die Glucoseabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit der Glykogenabnahme der Leber entspricht. Bei dem Vergleich der Glucoseabgabe in den einzelnen Perioden ergibt sich, daß in den Mittelwerten wie in allen Einzelversuchen in der ersten Periode mehr Glucose abgegeben wurde als in allen folgenden Perioden zusammen.

2. *Versuchsreihe.*

Die bei Zusatz von 0,5 Proz. Glucose zu der in den obigen Versuchen verwendeten Durchspülungsflüssigkeit erhaltenen Resultate sind in Tabelle II zusammengestellt.

Tabelle IIa.

Periode	mg Zucker an die Durchspülungsflüssigkeit abgegeben					Zuckerabgabe der Perioden 2 bis 5
	1	2	3	4	5	
Versuch 7 . .	154	224	151	— 52*)	40	363
„ 8 . .	906	657	246	254	132	1289
Mittel . . .	530	440	198	101	86	826

*) Negative Abgabe bedeutet Zuckeraufnahme durch die Leber.

[1]) Centralbl. f. Physiol. 19, 891, 1905.

Tabelle IIb.

	Leberglykogen		Zuckerkonzentration	
	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5
Versuch 7	74	23	814	372
„ 8	1757	82	550	366
Mittel . . .	915	52	682	369

Tabelle IIc.

	Leberglykogen- und Leberzuckerabnahme in Perioden 2 bis 5	Zuckerabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit in Perioden 2 bis 5	Bilanz
Versuch 7 . . .	493	363	— 130
„ 8 . . .	1859	1289	— 570
Mittel . . .	1176	826	— 350

Im Gegensatz zu der Versuchsreihe mit glucosefreier Durchströmungsflüssigkeit findet sich in beiden Versuchen mit glucosehaltiger Durchströmungsflüssigkeit ein Zuckerdefizit, dessen Mittelwert 350 mg pro 100 g Leber beträgt und sicher außerhalb der Fehlerbreite der Methodik liegt, da es sich auf 38 Proz. des Anfangsglykogengehalts beläuft.

3. Versuchsreihe.

Der Glucosezusatz zur Durchströmungsflüssigkeit in den folgenden Versuchen wurde in Versuch 10 auf 0,6 Proz. und in Versuch 9 auf 0,8 Proz. erhöht. Die Resultate zeigt Tabelle III.

Tabelle IIIa.

	mg Zucker an die Durchströmungsflüssigkeit abgegeben					Zuckerabgabe der Perioden 2 bis 5
Periode	1	2	3	4	5	
Versuch 10 . .	414	— 397	— 77	— 72	— 33	— 579
„ 9 . .	276	— 408	— 296	— 349	— 245	— 1298

Tabelle IIIb.

	Leberglykogen		Zuckerkonzentration der Leber	
	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5
Versuch 10	0	0	524	412
„ 9	54	30	460	531

Tabelle IIIc.

	Leberglykogen- und Leberzuckerabnahme in Perioden 2 bis 5	Zuckerabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit in Perioden 2 bis 5	Bilanz
Versuch 10 . . .	112	— 579	— 691
„ 9 . . .	—47	—1298	—1251

In Versuch 10 beträgt demnach die pro 100 g Leber verschwundene Zuckermenge 691 mg und in Versuch 9 1251 mg, Werte, die sicher außerhalb der Fehlergrenzen der Methodik liegen. Beim Vergleich mit den früheren Versuchsreihen ergibt sich die bemerkenswerte Tatsache, daß mit der Erhöhung des Glucosegehalts in der Durchströmungsflüssigkeit das Zuckerdefizit in der Bilanz immer größere Werte erreicht.

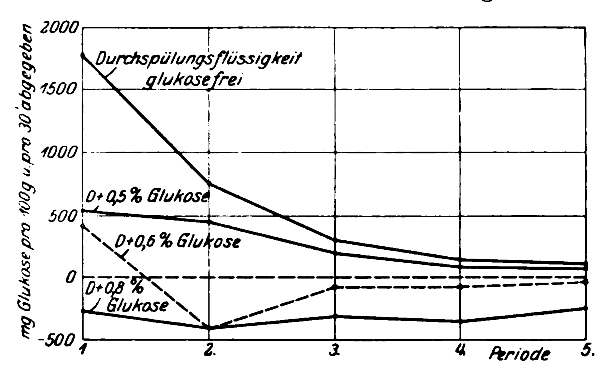


Abb. 1. Zuckerabgabe der Leber an die Durchströmungsflüssigkeit. Durchströmungsflüssigkeit enthält 0 bis 0,8 Proz. Glucose. Negative Abgabe = Aufnahme von Zucker durch die Leber.

In beiden Versuchen ist es bei fast fehlendem Anfangsglykogengehalt der Leber zu einem Verschwinden von Glucose gekommen. Zur Durchströmungsflüssigkeit des Versuchs 10 waren die von 40 ccm Kaninchenblut gewonnenen, gewaschenen Erythrocyten hinzugefügt, um eine bessere Sauerstoffversorgung der Leber zu erhalten. Da durch diese Modifikation der Methodik ein von den übrigen Resultaten nicht abweichendes Ergebnis erzielt worden ist, wurde sie wieder weggelassen.

Eine Übersicht über die Glucoseabgabe an die Durchspülungsflüssigkeit in allen fünf Perioden der bisher erwähnten Versuche gibt Abb. 1. Bei mehreren unter gleichen Bedingungen angestellten Versuchen wurde deren Mittelwert zur Darstellung verwendet.

4. Versuchsreihe.

Bei den folgenden Versuchen mit einer 1 Proz. Glucose enthaltenden Durchspülungsflüssigkeit wurde eine andere Salzlösung benutzt; sie enthielt außer 1 Proz. Glucose 0,65 Proz. NaCl, 0,02 Proz. KCl, 0,02 Proz. $CaCl_2$, 0,005 Proz. NaH_2PO_4 und 0,1 Proz. $NaHCO_3$. Die Ergebnisse sind in Tabelle IV zusammengestellt.

Tabelle IV a.

Periode	mg Zucker an die Durchströmungsflüssigkeit abgegeben					Zuckerabgabe der Perioden 2 bis 5
	1	2	3	4	5	
Versuch 19 . .	—1019	—184	—184	— 24	—379	—771
„ 21 . .	— 754	— 22	— 27	—244	318	25
„ 24 . .	180	449	326	—102	—143	530
„ 31 . .	844	577	217	48	141	983
Mittel . . .	— 187	205	83	— 80	— 16	192

Tabelle IV b.

	Leberglykogen		Zuckerkonzentration der Leber	
	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5
Versuch 19	0	0	900	800
„ 21	1600	310	1040	760
„ 24	2300	170	900	950
„ 31	1986	424	630	560
Mittel . . .	1471	226	867	767

Tabelle IV c.

	Leberglykogen- und Leberzuckerabnahme in Perioden 2 bis 5	Zuckerabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit in Perioden 2 bis 5	Bilanz
Versuch 19 . . .	100	—771	— 881
„ 21 . . .	1570	25	—1545
„ 24 . . .	2080	530	—1550
„ 31 . . .	1632	983	— 649
Mittel . . .	1346	192	—1156

Tabelle V gibt die Resultate bei Durchströmung mit insulinhaltiger Durchspülungsflüssigkeit an. Die in der Tabelle angeführte Insulinmenge war in 500 ccm Durchspülungsflüssigkeit enthalten. Da in fünf Perioden nur die Hälfte dieser Flüssigkeit die Leber passierte, wurde auch nur die Hälfte der angegebenen Insulinmenge der Leber angeboten. Der Vergleich der Tabellen IV und V ergibt, daß der Insulinzusatz das Zuckerdefizit von 1156 mg auf 2600 mg, d. h. auf das 2,25fache erhöht hat.

Tabelle V a.

Periode	mg Zucker an die Durchströmungsflüssigkeit abgegeben					Zuckerabgabe der Perioden 2 bis 5	Insulin „Brand" pro 500 ccm ccm
	1	2	3	4	5		
Versuch 20 . .	290	—447	—335	—372	—768	—1922	1,0
„ 22 . .	24	166	108	— 30	—243	1	1,5
„ 29 . .	271	465	— 69	—214	— 98	84	0,4
„ 30 . .	137	442	265	—181	144	670	1,0
Mittel . . .	180	156	— 8	—199	—241	— 292	

Tabelle Vb.

	Leberglykogen		Zuckerkonzentration der Leber	
	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5
Versuch 20	1125	143	1130	740
„ 22	3181	159	800	650
„ 29	1850	114	900	700
„ 30	3600	806	850	918
Mittel . . .	2439	305	920	752

Tabelle Vc.

	Leberglykogen- und Leberzuckerabnahme in Perioden 2 bis 5	Zuckerabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit in Perioden 2 bis 5	Bilanz
Versuch 20 . . .	1372	—1912	—3294
„ 22 . . .	3172	1	—3171
„ 29 . . .	1936	84	—1852
„ 30 . . .	2746	670	—2076
Mittel . . .	2307	— 292	—2599

Wenn auch der Mittelwert der Insulinversuche ein über zweimal größeres Zuckerdefizit als derjenige der entsprechenden Normalversuche ergibt, ist in Anbetracht der erheblichen Schwankungen in der Zuckerbilanz der Einzelversuche dennoch die Frage zu erörtern, ob die Differenz zwischen Normal- und Insulinversuchen nicht in die Fehlerbreite der Methodik fällt. Um diese Möglichkeit zu prüfen, wurde bei Verwendung glucosehaltiger Durchströmungsflüssigkeit in diesen Versuchen stets zu Beginn und am Schlusse jedes Versuchs eine Kontrollbestimmung des Zuckergehalts in der nicht durch die Leber geflossenen Durchströmungsflüssigkeit angestellt. Die Differenz zwischen beiden Bestimmungen in Milligrammen gibt den für jede einzelne Periode zu berücksichtigenden Analysenfehler an. Da bei einer 1 Proz. Glucose enthaltenden Durchströmungsflüssigkeit nur 7 ccm Analysenmaterial verwendet werden konnten, mußte die Differenz der beiden Kontrollen, da die Durchspülungsmenge pro eine halbe Stunde 50 ccm betrug, ebenfalls auf 50 ccm umgerechnet werden, ehe sie, wie die übrigen Resultate des Versuches, von dem durchspülten Lebergewicht ausgehend, auf 100 g Leber umgerechnet werden konnte. Ein Beispiel soll die Berechnung erläutern. In Versuch 22 betrug der Glucosegehalt in 7 ccm der nicht durch die Leber geflossenen Flüssigkeit vor Beginn des Versuchs 51,9 mg und in der zweiten Probe (entnommen $2\frac{1}{2}$ Stunden später, nach Abschluß des Versuchs) 51,4 mg. Die Differenz in 7 ccm beläuft sich demnach auf 0,5 mg, für 50 ccm also auf 3,57 mg. Die zur Durchspülung nach Abbindung des ersten

Leberlappens benutzte Lebersubstanz wog 5,1 g. Auf 100 g Leber umgerechnet, beträgt der Fehler für jede einzelne Periode demnach 70 mg. Dieser Wert erhöht sich bei der Zuckerbilanzberechnung auf den vierfachen Betrag, da dann die Fehlergröße von vier Perioden berücksichtigt werden muß. In Tabelle VI sind die auf diesem Wege berechneten Fehler für die Normal- und Insulinversuche zusammengestellt.

Tabelle VIa.

Fehler der Normalversuche pro 100 g Leber.

	Lebergewicht g	Differenz der Kontrollen: pro 50 ccm mg	pro 100 g Leber und Periode mg	in vier Perioden pro 100 g Leber mg
Versuch 19	3,8	2,0	53	212
„ 21	4,3	0	0	0
„ 24	4,2	0	0	0
„ 31	3,7	3,5	94	376
Mittel . . .	4,0	1,4	37	147

Tabelle VIb.

Fehler der Insulinversuche.

Versuch 20	4,3	0	0	0
„ 22	5,1	3,6	70	280
„ 29	4,1	7	170	680
„ 30	3,5	0	0	0
Mittel . . .	4,25	2,7	60	240

Der Mittelwert der Analysenfehler bei der Bestimmung des Zuckergehalts der Durchströmungsflüssigkeit beträgt demnach in den Normalversuchen 15 Proz., in den Insulinversuchen 9 Proz. der Mittelwerte des Zuckerdefizits. In den Einzelversuchen der Insulinreihe erreicht die Fehlergröße maximale Werte von 36 Proz. und in der Kontrollreihe von 57 Proz. des Endwertes. Kann schon unter Berücksichtigung der maximalen Werte die Behauptung aufrecht erhalten werden, daß durch Insulinzusatz mehr Zucker aus der Leber verschwindet als in den Parallelversuchen, so trifft diese Feststellung bei Benutzung der Mittelwerte erst recht zu. Die Fehlergröße in den Insulinversuchen beträgt 9,2 Proz. und in den Normalversuchen 12,7 Proz. vom Mittelwert des Zuckerdefizits. Da diese Werte nahezu zusammenfallen, ist in beiden Versuchsreihen mit der nämlichen Fehlerbreite zu rechnen. In den Versuchen ohne Insulin in der Durchströmungsflüssigkeit verschwanden durchschnittlich 1156 mg pro 100 g Leber und in denjenigen mit Insulin 2599 mg. Durch Insulinzusatz wird demnach der Betrag des verschwundenen Zuckers in der Leber um über das Doppelte erhöht.

Die sich aus den Glykogenanalysen und den Zuckerkonzentrationsbestimmungen ergebenden Analysenfehler sind in den oben errechneten Werten nicht enthalten. Sie können jedoch vernachlässigt werden, da bei der Bestimmung der Zuckerkonzentration nahezu das Gesamtmaterial und bei der Glykogenbestimmung es vollständig zu der Analyse verwendet wurde. Eine ferner zu berücksichtigende Ungenauigkeit in der Methodik wird durch den verschieden hohen Glykogengehalt der einzelnen Leberlappen bedingt. Da die Schwankungen im Glykogengehalt der Leberlappen bis zu 10 Proz. betragen können, muß diese Fehlergröße im Verein mit den übrigen errechneten Fehlerquellen zur

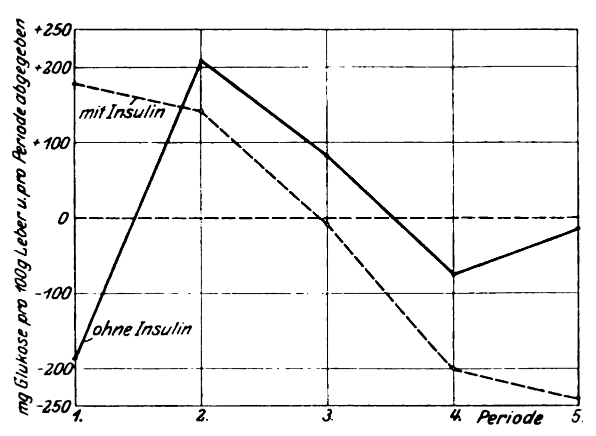


Abb. 2. Zuckerabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit mit und ohne Insulin. Durchströmungsflüssigkeit enthält 1 Proz. Glucose.

Versuchskritik herangezogen werden. Der Leberglykogengehalt schwankte in diesen Versuchen zwischen 0 und 3600 mg, die Mittelwerte betragen 1500 und 2500 mg, die möglichen Fehler also 150 bis 250 mg oder 10 bis 13 Proz. des Zuckerdefizits. Ich schätze daher den Fehler der Mittelwerte der Zuckerbilanz auf 10 bis 20 Proz.

Die Zuckeraufnahme und -abgabe mit und ohne Insulin ist in Abb. 2 dargestellt. In der ersten Periode der Insulinversuche kommt es zu einer Zuckerabgabe und in der ersten Periode der Normalreihe zu einer Zuckeraufnahme. Dieses Verhalten wird durch den verschieden großen Anfangsglykogengehalt der Lebern verursacht. Der Mittelwert des Glykogens beträgt in den Normalversuchen 1471 mg pro 100 g Leber und in den Insulinversuchen 2439 mg. Da in der ersten Periode mehr Glykogen hydrolysiert wird wie in den vier folgenden (s. auch *Iwanoff*), muß bei hohem Anfangsglykogengehalt der Leber deren Zuckerkonzentration früher diejenige der Durchspülungsflüssigkeit erreichen oder übertreffen als bei niedrigerem Anfangsglykogengehalt. Daß es mit

Insulinzusatz zur Durchströmungsflüssigkeit in der ersten Periode zu einer Zuckerabgabe und in den Normalversuchen zu einer Zuckeraufnahme gekommen ist, wird dadurch erklärt und widerspricht nicht dem Ergebnis der folgenden Perioden. In diesen Perioden verlaufen, wie Abb. 2 zeigt, die Kurven für die Zuckerabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit parallel, doch liegt die Insulinkurve tiefer als die Normalkurve. Es findet sich in der zweiten und dritten Periode der Insulinversuche eine geringere Zuckerabgabe und in der vierten und fünften Periode eine größere Zuckeraufnahme wie in den Normalperioden.

5. Versuchsreihe.

Bei den folgenden Versuchen gelangte eine andere Durchspülungsflüssigkeit zur Verwendung. Sie enthielt außer einem auf 2 Proz. erhöhten Glucosegehalt 0,49 Proz. NaCl, 0,01 Proz. $CaCl_2$, 0,01 Proz. KCl und 0,01 Proz. $NaHCO_3$. . Die Gefrierpunktserniedrigung der Lösung betrug $-0{,}59^0$. In Tabelle VII sind die mit dieser Nährflüssigkeit erhaltenen Werte wiedergegeben.

Tabelle VIIa.

	mg Zucker an die Durchspülungsflüssigkeit abgegeben					Zuckerabgabe der Perioden 2 bis 5
Periode	1	2	3	4	5	
Versuch 12 . .	—1475	— 173	—541	— 122	— 644	—1480
„ 18 . .	—1494	—1636	—137	—1209	—1500	—4482
„ 27 . .	— 190	— 190	— 88	— 615	73	— 820
„ 28 . .	— 702	— 100	—944	— 830	177	—1697
Mittel . . .	— 965	— 525	—428	— 694	— 473	—2119

Tabelle VIIb.

	Leberglykogen		Zuckerkonzentration der Leber	
	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5
Versuch 12	1040	500	1400	1400
„ 18	118	450	1300	1500
„ 27	1664	795	1260	1324
„ 28	2272	1620	1300	1500
Mittel . . .	1274	740	1320	1430

Tabelle VIIc.

	Leberglykogen- und Leberzuckerabnahme in Perioden 2 bis 5	Zuckerabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit in Perioden 2 bis 5	Bilanz
Versuch 12 . . .	536	—1480	—2016
„ 18 . . .	—127	—4482	—4355
„ 27 . . .	805	— 820	—1625
„ 28 . . .	488	—1697	—2185
Mittel . . .	426	—2119	—2545

In Tabelle VIII sind die unter den gleichen Bedingungen bei Insulinzusatz ausgeführten Versuche zusammengestellt. Die angegebene Insulinmenge wurde bei der Herstellung der Durchspülungsflüssigkeit zu 500 ccm Flüssigkeit zugegeben analog den früheren Insulinversuchen.

Tabelle VIIIa.

Periode	mg Zucker an die Durchströmungsflüssigkeit abgegeben					Zuckerabgabe der Perioden 2 bis 5	Insulin „Brand" pro 500 ccm ccm
	1	2	3	4	5		
Versuch 13 .	— 922	— 1440	— 860	— 1075	— 1366	— 4741	0,15
„ 14 .	— 1087	— 2671	— 3100	— 2288	— 1834	— 9893	0,3
„ 16 .	— 800	— 512	— 582	— 985	— 1382	— 3461	0,3
„ 17 .	— 1225	— 1842	— 1128	— 1033	— 850	— 4853	0,15
Mittel . . .	— 1009	— 1616	— 1417	— 1345	— 1358	— 5737	

Tabelle VIIIb.

	Leberglykogen		Zuckerkonzentration der Leber	
	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5
Versuch 13	1668	697	1370	1400
„ 14	3009	2400	1240	1390
„ 16	0	0	1382	1467
„ 17	1267	458	1400	1400
Mittel . . .	1486	889	1348	1414

Tabelle VIIIc.

	Leberglykogen- und Leberzuckerabnahme in Perioden 2 bis 5	Zuckerabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit in Perioden 2 bis 5	Bilanz
Versuch 13 . . .	941	— 4741	— 5 682
„ 14 . . .	459	— 9893	— 10 352
„ 16 . . .	— 85	— 3461	— 3 376
„ 17 . . .	809	— 4853	— 5 662
Mittel . . .	531	— 5737	— 6 268

Die für die beiden Versuchsreihen auf die bereits beschriebene Art und Weise aus den zwei Kontrollen errechneten Fehlergrößen sind in Tabelle IX zusammengefaßt.

Tabelle IX a.

Fehler der Normalversuche pro 100 g Leber.

	Lebergewicht	Differenz der Kontrollen		
		pro 50 ccm	pro 100 g Leber und Periode	in vier Perioden pro 100 g Leber
	g	mg	mg	mg
Versuch 12	7,2	0	0	0
„ 18	2,8	0	0	0
„ 27	4,1	4,8	119	476
„ 28	4,3	8,4	195	780
Mittel . . .	4,6	3,3	78	314

Tabelle IX b.

Fehler der Insulinversuche.

Versuch 13	6,3	9,6	152	608
„ 14	7,2	21,6	298	1192
„ 16	3,3	9,6	290	1160
„ 17	3,6	9,6	267	1068
Mittel . . .	5,1	12,6	252	1007

In den Einzelversuchen beträgt die Fehlergröße maximal 35 Proz. ohne Insulin und 34 Proz. mit Insulin, im Mittelwert ohne Insulin 12 Proz. und mit Insulin 18 Proz. Da die prozentualen Schwankungen

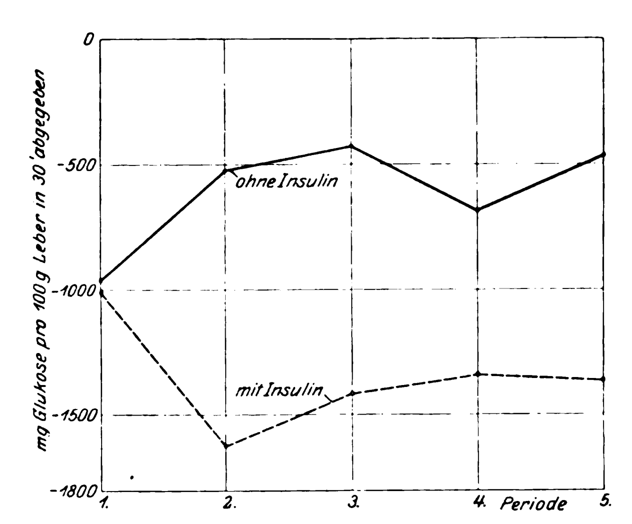


Abb. 3. Zuckerabgabe an die Durchströmungsflüssigkeit mit und ohne Insulin. Durchströmungsflüssigkeit enthalt 2 Proz. Glucose.

für beide Versuchsreihen annähernd gleich sind, können die Mittelwerte gut verglichen werden. In den Versuchen ohne Insulin verschwanden 2545 mg Zucker pro 100 g Leber im Mittelwert und bei

Insulinzusatz 6268 mg. Ähnlich wie bei den Versuchen mit 1 Proz. Glucose enthaltender Durchströmungsflüssigkeit wird auch in dieser Versuchsreihe durch Insulinzusatz das Zuckerdefizit in der Leber um über den doppelten Betrag erhöht.

In Anbetracht des großen Zuckerdefizits hätte man eine geringere prozentuale Fehlergröße erwarten müssen wie in den Versuchen mit 1 Proz. Glucose in der Durchströmungsflüssigkeit. Mit der *Bertrand*schen Methode konnten jedoch für jede Periode jetzt nur noch 4 ccm der Durch-

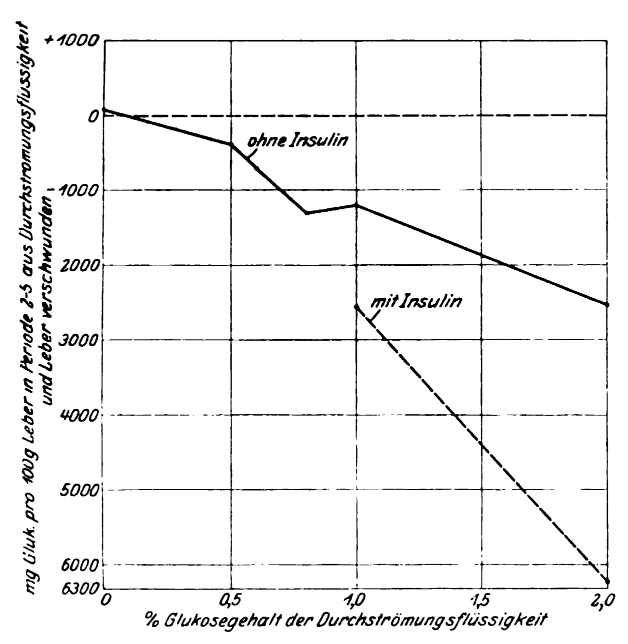


Abb. 4. Zuckerbilanz bei gewichenem Glucosegehalt der Durchströmungsflüssigkeit mit und ohne Insulin.

spülungsflüssigkeit auf reduzierende Substanz verarbeitet werden, so daß die aus den beiden Kontrollen vor und nach dem Versuch sich ergebende Differenz nicht wie bei der vorhergehenden Versuchsreihe zur Umrechnung auf 50 ccm mit 7,1, sondern mit 12,5 multipliziert werden mußte.

Auch die Mittelwerte der einzelnen Perioden mit und ohne Insulin (Abb. 3) zeigen, wie durch Insulin eine größere Zuckeraufnahme durch die Leber stattfindet. In sämtlichen zur Zuckerbilanzberechnung verwendeten Perioden liegt die größere Zuckeraufnahme der Insulinversuche gegenüber den Parallelversuchen außerhalb der Fehlerbreite der für die einzelne Periode berechneten Werte.

C. Ergebnisse.

Bei Durchspülung der Rattenleber mit glucosefreier Ringerlösung entspricht die Glucoseabgabe nahezu der Glykogenabnahme und der Abnahme des freien Leberzuckers. Bei Zusatz von Traubenzucker zu der Durchspülungsflüssigkeit verschwindet Zucker in der Leber. und zwar um so mehr, je höher der Glucosegehalt der Durchströmungsflüssigkeit ist (s. Abb. 4 und Tabelle X).

Tabelle X.

Glucosegehalt der Durchströmungsflüssigkeit Proz.	Verschwundene Glucose pro 100 g Leber und 2h		Mittelwert aus ? Versuchen
	ohne Insulin mg	mit Insulin mg	
0,5	— 400	—	2
0,6	— 691	—	1
0,8	— 1251	—	1
1,0	— 1156	— 2599	je 4
2,0	— 2545	— 6268	je 4

Dieses Verschwinden von Zucker in der Leber wird durch Insulinzusatz zur Durchströmungsflüssigkeit auf über das Doppelte erhöht.

Ob der verschwundene Zucker aus den Produkten der Glykogenhydrolyse oder aus dem Zucker der Durchströmungsflüssigkeit stammt, scheint gleichgültig zu sein. Sicher ist jedoch, daß er allein aus dem Zucker der Durchströmungsflüssigkeit herrühren kann, wie die Versuche mit geringem oder fast fehlendem Anfangsglykogengehalt dartun, in denen beträchtliche Mengen von Zucker verschwanden. Der Anfangsglykogengehalt seinerseits hat auf die Größe des Zuckerdefizits keinen Einfluß.

Im Gegensatz zu den Arbeiten von *Grube* und *Barrenscheen* wurde in unseren Versuchen keine Glykogensynthese bei Verwendung von Durchströmungsflüssigkeiten mit hohem Glucosegehalt erhalten. Man sieht jedoch (Tabelle XI), daß mit steigendem Glucosegehalt der Durchströmungsflüssigkeit die Glykogenhydrolyse zurückgedrängt wird. Wenn die Glykogenabnahme in Prozenten des Glykogengehalts der Leber zu Beginn der Periode 2 ausgedrückt wird, so erhält man eine

Tabelle XI.

Glucosegehalt der Durchströmungsflüssigkeit Proz.	Glykogenabnahme der Leber	
	ohne Insulin Proz.	mit Insulin Proz.
0,0	93,6	—
0,5	94,2	—
1,0	84,5	87,5
2,0	32,0	40,2

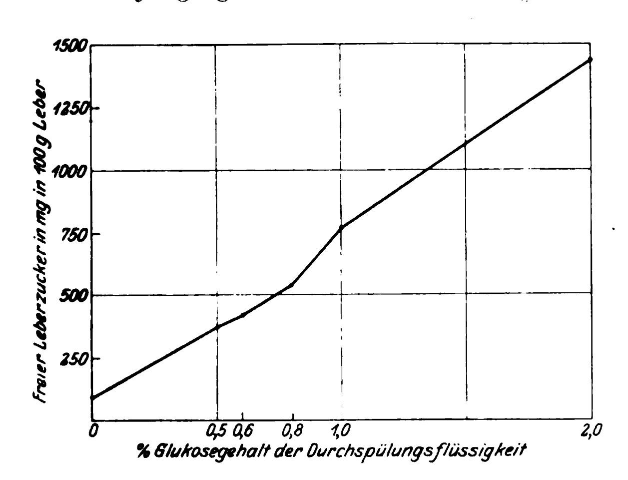
deutliche Hemmung der Glykogenhydrolyse erst mit einer 2 Proz. Glucose enthaltenden Durchströmungsflüssigkeit. Auf diesen Prozeß hat bei unserer Versuchsanordnung das Insulin keinen Einfluß.

Die Zuckerkonzentrationen in der Leber zu Beginn der zweiten Periode und am Ende der fünften Periode bei verschiedenem Glucosegehalt der Durchspülungsflüssigkeit sind in Tabelle XII zusammengestellt.

Tabelle XII.

Glucosegehalt der Durchspülungsflüssigkeit	Zuckerkonzentration der Leber in Proz.			
	ohne Insulin		mit Insulin	
	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5	zu Beginn von Periode 2	am Schlusse von Periode 5
Proz.	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
0,0	0,427	0,093	—	—
0,5	0,682	0,369	—	—
0,6	0,524	0,412	—	—
0,8	0,460	0,531	—	—
1,0	0,867	0,767	0,920	0,752
2,0	1,320	1,430	1,348	1,414

Zur graphischen Darstellung (Abb. 5) ist nur die Zuckerkonzentration am Schlusse jedes Versuchs berücksichtigt worden, da zu Beginn der Durchspülung die Zuckerkonzentration der Leber durch den verschieden hohen Glykogengehalt starken Schwankungen unterworfen ist.



Man erkennt zunächst, daß der Gehalt der Leber an freiem Zucker eine lineare Funktion des Zuckergehalts der Durchströmungsflüssigkeit ist. Ich habe früher an der Froschleber[1]), bei der ich jedoch nur die

[1]) *Bernhard*, diese Zeitschr. 153, 61, 1924.

Zuckeraufnahme oder -abgabe durch die Leber bestimmt habe, ebenfalls gefunden, daß die aufgenommenen oder abgegebenen Zuckermengen eine lineare Funktion der Zuckerkonzentration der Durchströmungsflüssigkeit darstellen.

In Tabelle XIII ist der Quotient

$$\frac{\text{Zuckerkonzentration}^{1)} \text{ in der Leber}}{\text{Zuckerkonzentration}^{1)} \text{ in der Durchströmungsflüssigkeit}}$$

gebildet. Man sieht, daß diese Größe innerhalb der gewählten Zuckerkonzentrationen eine Konstante darstellt. Man kann das entweder so auffassen, daß die Lebersubstanz ein etwas schlechteres Lösungsmittel für Zucker darstellt als *Ringer*sche Lösung, und daß sich der Zucker mit konstanten Verteilungskoeffizienten auf beide Lösungsmittel verteilt, oder daß nur ein Teil des Lebergewebes als Lösungsmittel für Zucker fungiert, in welchem der Zucker dann ebensogut löslich wäre wie in *Ringer*scher Lösung. Da die Leber etwa 70 Proz. Wasser enthält, der freie Leberzucker aber 74 Proz. der Zuckerkonzentration der Durchströmungsflüssigkeit beträgt, müßten dann, außer dem Wasser, in der Leber noch andere Stoffe, allerdings in geringem Maße, als Lösungsmittel für Zucker fungieren.

Tabelle XIII.

Leberzucker am Ende der Periode 5 = C_1 Proz.	Zuckergehalt der Durchströmungsflüssigkeit nach Austritt aus der Leber am Ende der Periode 5 = C_2 Proz.	$\frac{C_1}{C_2}$	Zahl der Versuche aus denen der Mittelwert genommen
0,37	0,508	0,73	2
0,41	0,576	0,71	1
0,53	0,776	0,68	1
0,75 *)	0,980	0,77	4
0,77	0,990	0,77	4
1,41 *)	1,862	0,76	4
1,43	1,960	0,73	4
	Mittelwert . . .	0,736 ± 0,012	

*) Insulinversuche.

Bemerkenswert erscheint noch die Übereinstimmung der Leberzuckerkonzentration zu Beginn und am Schlusse der Versuche mit und ohne Insulin, was ebenso wie die Versuche von *Cori*, *Cori* und *Goltz*[2]) zeigt, daß das Insulin auf die Permeabilität der Leberzelle für Traubenzucker keinen Einfluß hat.

Es entsteht die Frage, was aus dem verschwundenen Zucker geworden ist. Man könnte an eine Oxydation des Zuckers denken.

[1]) Beide Werte am Schluß von Periode 5.
[2]) *Cori*, *Cori* und *Goltz*, Il. pharmacol. a. exp. therap. 22, 355, 1923.

Nach *Masings*[1]) Zahlen für die Kaninchenleber ergibt sich ein O_2-Verbrauch von etwa 100 ccm pro 100 g Leber und Stunde, welche 134 mg Zucker verbrennen könnten. Man sieht also, daß der verschwundene Zucker, der bei einem Glucosegehalt von 1 Proz. in der Durchströmungsflüssigkeit bereits 550 mg pro 100 g Leber und Stunde beträgt, nicht oxydiert sein kann. Außerdem erhöht nach *Masing* Zuckerzusatz zur Durchströmungsflüssigkeit den Sauerstoffverbrauch der künstlich durchbluteten Kaninchenleber nicht. Es muß sich demnach um eine anoxybiotische Zuckertransformation handeln.

Mit Rücksicht auf die Befunde von *Embden* und *Kraus*[2]) über Milchsäurebildung bei Durchströmung der Leber mit traubenzuckerreicher Durchströmungsflüssigkeit scheint es am wahrscheinlichsten, daß der verschwundene Zucker zu Milchsäure geworden ist. Wenn diese Annahme, die gegenwärtig von mir experimentell geprüft wird, richtig ist, würde sich die wichtige Feststellung ergeben, daß das Insulin die Milchsäurebildung aus Traubenzucker in der Leber stark beschleunigt. Außer dieser Möglichkeit wird noch eine zweite geprüft, ob nämlich der verschwundene Traubenzucker zu zwischen Glykogen und Glucose gelegenen Zwischenprodukten polymerisiert worden ist.

Zusammenfassung.

1. Die von der herausgeschnittenen Rattenleber bei Durchspülung mit glucosefreier Ringerlösung abgegebene Zuckermenge entspricht der in der gleichen Zeit vor sich gehenden Abnahme des Glykogens und des Leberzuckers.

2. Bei Verwendung glucosehaltiger Durchströmungsflüssigkeiten verschwindet in der Leber Zucker, der nicht zu Glykogen wird.

3. Die verschwundene Zuckermenge steigt nahezu proportional dem Glucosegehalt der Durchspülungsflüssigkeit.

4. Bei Gegenwart von Insulin verschwindet über zweimal so viel Zucker als in den entsprechenden Versuchen ohne Insulin.

5. Eine Glykogensynthese wurde mit unserer Methodik nicht erzielt. Bei Durchspülung mit einer 2 Proz. Glucose enthaltenden Ringerlösung fand sich aber eine Hemmung der Glykogenhydrolyse um 50 Proz.

6. Das Insulin war ohne Einfluß auf die Geschwindigkeit der Glykogenhydrolyse.

7. Der Gehalt der Leber an Zucker ist dem Glucosegehalt der Durchspülungsflüssigkeit direkt proportional.

8. Das Insulin beeinflußt die Permeabilität der Leberzellen für Traubenzucker nicht.

---

[1]) *Masing*, Schmiedebergs Arch. 69, 431, 1912.

[2]) *Embden* und *Kraus*, diese Zeitschr. 45, 108, 1912.

Über Lipoide.

Von

Sigmund Fränkel.

XX. Mitteilung:

Über die Hypohirnsäure,

ein neues Triaminomonophosphormonosulfatid aus Menschenhirn (Oxydecansäure-Tricolaminglycerinphosphorglycerinschwefelsäure).

Von

Sigmund Fränkel und Otto Karpfen.

(Aus dem Laboratorium der Ludwig-Spiegler-Stiftung, Wien.)

(Eingegangen am 26. Februar 1925.)

Schon *Thudichum*[1]) wußte, daß im Gehirn neben Phosphatiden schwefelhaltige Körper vorkommen, die er Cerebrosulfatide nannte.

Er fand einzelne seiner Präparate schwefelhaltig, ohne sie aber genügend reinigen zu können, und beschrieb ein Bleisalz, welches 1,62 Proz. Schwefel und 2,97 Proz. Phosphor enthielt, so daß nach Abrechnung des Bleies die Substanz 2,11 Proz. Schwefel und 3,79 Proz. Phosphor enthalten würde. Aber dieses Salz ist nach seiner eigenen Angabe ein Gemenge von fünf verschiedenen Substanzen. Ferner fand *Thudichum* ein schwefelhaltiges „Cerebrinacid", und zwar ein Barytsalz, welches bei der Analyse so viel Schwefel ergab, daß dieser Schwefelgehalt einer einfachen Verunreinigung mit Sulfat nicht zugeschrieben werden konnte. Da er auch kristallisierten Schwefel in Katzenhirnen fand, untersuchte er seine Präparate auf unoxydierten oder gebundenen Schwefel und fand diesen in bedeutenden Mengen. Er gibt an, eine schwefel- und phosphorhaltige Verbindung analysiert zu haben, in der sich S : Ba wie 1 : 2, S : N wie 1 : 0,42 und S : P wie 1 : 0,65 verhielten. Man sieht daraus, daß er eine schwefel- und phosphorhaltige Verbindung erhielt, deren Bruttoformel sich wegen ihrer starken Verunreinigung nicht berechnen ließ. Sie verhielt sich wie ein „Cerebrinacid" und bildete Bleisalze. In den Barytsalzen schwankte der Schwefelgehalt zwischen 1,5 und 4 Proz.; der Phosphor steht aber dazu in keinem rationellen Verhältnis, so daß er die ganze Verbindung für ein verunreinigtes Phosphatid hielt, während *Vauquelin* in den mit Alkohol aus Gehirn extrahierten Substanzen keinen Schwefel fand.

---

[1]) *Thudichum*, Chem. Konstitution des Gehirns. S. 224f. Tübingen 1901.

Waldemar Koch[1]) hat dann angenommen, daß die Sulfatide äquimolekulare Mengen Schwefelsäure und Phosphorsäure enthalten und die Phosphatide mit den Cerebrosiden durch die Schwefelsäure verbunden sind, eine Annahme, die sich als vollständig irrig erweist, da er sämtliche Bestandteile des sogenannten Protagons, der weißen Substanz, in seiner Sulfatid-Phosphatid-Cerebrosidformel vereinigt hatte. *Levene* hat[2]) nach einem nicht beschriebenen Verfahren und ohne Angabe in welcher Fraktion, aus Ochsenhirn einen schwefelhaltigen Körper erhalten, der phosphorfrei war und von dem er nur sagt, daß sein Aussehen und viele seiner Eigenschaften an Lipoide erinnern, und daß er 2,66 Proz. Schwefel und 2,31 Proz. Stickstoff enthielt. Diese Zahlen beweisen schon durch ihre Relation, daß der Körper unrein ist; die Substanz war aber weiter nicht zu reinigen. Dabei ist aber von Interesse, daß dieser Körper sich nach *Levenes* Angaben als phosphorfrei erwies.

Bei den Untersuchungen unseres Instituts[3]) wurde gezeigt, daß der von Cerebrosiden befreite Teil des Protagons in Form der Barytsalze zerlegt werden kann in einen benzollöslichen und einen benzolunlöslichen Teil. Der benzollösliche Teil erwies sich teilweise in Petroläther löslich. Das petrolätherlösliche Bariumsalz, von uns *hirnsaures Barium* genannt, wurde analysiert und hydrolysiert und erwies sich als ein Phosphorsulfatid mit der Relation S : P : N wie 1 : 1 : 3. Daneben konnten wir aus den Mutterlaugen eine zweite Substanz in kleinen Mengen finden, welche schwefelfrei war und eine Relation N : P wie 2 : 3 zeigte. Die Hirnsäure wurde hydrolysiert und hierbei Phosphorsäure, Schwefelsäure, Aminoäthylalkohol und Cerebronsäure gefunden. An der Konstitutionsermittlung dieses Körpers wird noch gearbeitet.

Um den benzolunlöslichen Anteil näher zu untersuchen, haben wir letzteres in größerer Menge aus Gehirnen nach dem Verfahren der fraktionierten Extraktion[4]) mit Aceton, Petroläther und Alkohol dargestellt und daraus, wie im experimentellen Teile beschrieben, ein neues Triaminophosphorsulfatid erhalten, einen gut kristallisierenden Körper, der den Schmelzpunkt 196° zeigt, dessen Bruttoformel sich zu $C_{101}H_{152}N_3PSO_{26}$ berechnet und in dem alle drei Stickstoffatome in Form von Aminostickstoff enthalten sind. Die Relation S : P : N verhält sich wie 1 : 1 : 3. In diesem letzteren wie in einigen anderen Punkten stimmt der neue Körper mit der früher erwähnten Hirnsäure auffallend überein. So ist auch ebenso wie dort der ganze Stickstoff als Aminostickstoff enthalten. Während aber an der Zusammensetzung der Hirnsäure die Cerebronsäure und an der des von

---

1) *W. Koch*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **70**, 94, 1910.
2) *Levene*, Journ. of biol. Chem. **13**, 463, 1913.
3) *S. Fränkel* und *O. Gilbert*, diese Zeitschr. **124**, 206, 1921.
4) *S. Fränkel*, Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden, 2. Aufl., Abt. I, Teil 6, S. 1, 1923.

S. Fränkel und *F. Kafka*[1]) beschriebenen Phosphatids aus der Myelinfraktion die Lignocerinsäure teilnimmt, ist das bei unserer neuen Verbindung nicht der Fall, sondern es ist eine weitaus niedrigere Oxysäure in dieser neuen Verbindung enthalten. Der ganze Stickstoff war ebenso wie bei der Hirnsäure in Form von Colamin enthalten, während das von *Levene*[2]) bei der Hydrolyse des Sphingomyelins erhaltene Cholin von uns nicht gefunden wurde; es sind also die beiden von uns gefundenen neuen Phosphorsulfatide, welche beide Colamin als Base enthalten, durchaus vom Sphingomyelin verschieden.

Außer Phosphorsäure, Schwefelsäure und Colamin haben wir noch reichliche Mengen Glycerin gefunden, Mengen, die über das Quantum hinausgehen, das rechnungsmäßig für die Bindung als Glycerinschwefelsäure und Glycerinphosphorsäure notwendig erscheint, und zwar fast doppelt so viel. Folglich ist das Glycerin noch anders verestert. Ebenso entsprechen der Berechnung, wenn man annimmt, daß das Colamin nur mit der Schwefelsäure und Phosphorsäure verestert ist, zwei Colamine, während unsere Analyse drei ergab, was erwiesen ist dadurch, daß wir Colamin als einzige Base fanden und alle drei Stickstoffe als Aminostickstoffe durch die *van-Slyke*-Bestimmung sich erweisen, während Cholin keinen Aminostickstoff enthält, weshalb Cholin ausgeschlossen ist. Sphingosin oder eine noch unbekannte Base wären der Aufmerksamkeit nicht entgangen. Das dritte Colamin ist also in einer noch nicht festgestellten Form im Molekül enthalten.

Die quantitative Bestimmung des Colamins in der neuen Verbindung ergibt ebenfalls, daß aller Stickstoff in Form von Colamin vorhanden ist, da drei Colaminmoleküle in dem Phosphorsulfatid 9 Proz. ausmachen und wir bei der sauren Hydrolyse 9 Proz. Colamin gefunden haben.

Von größtem Interesse erscheint die Auffindung einer neuen niedrigen Oxysäure von zehn Kohlenstoffatomen. Eine niedrigere Oxysäure als die Cerebronsäure hatte schon *Levene*[2]) bei der Hydrolyse des Sphingomyelins vermutet, ohne sie näher definieren zu können.

Wir haben die Konstitutionsbestimmung der von uns gefundenen neuen Oxysäure durchgeführt; alles weist auf eine α-n-Oxydecansäure hin.

Aus ihrer und ihrer Derivate Analysen geht dies hervor, ebenso wie die Oxydation zur Pelargonsäure, die durch ihre Salze identifiziert wurde, die Stellung der Hydroxylgruppe erweist. Durch den Nachweis der Pelargonsäure ist festgestellt, daß die gefundene α-Oxydecansäure eine unverzweigte Kette besitzt, da ja die Pelargonsäure

[1]) *S. Fränkel* und *F. Kafka*, diese Zeitschr. **101**, 159, 1920.
[2]) *Levene*, Journ. of biol. Chem. **24**, 69, 1916.

eine normale Nonansäure ist, und zugleich ist dadurch die Stellung des Hydroxyls am α-Kohlenstoff bewiesen. Doch ist es sehr auffällig, daß die gefundene Säure mit der von *Bagard*[1]) synthetisch dargestellten α-n-Oxydecansäure nicht identisch ist.

Bagard erhielt die Undecanol-(2-)-säure-(1), die α-Oxy-decan-α-carbonsäure $C_{11}H_{22}O_3 = CH_3 . [CH_2]_8 . CH(OH) . COOH$ in folgender Weise: Er bromierte Undecansäurechlorid und erhielt α-Brom-undecansäurechlorid, welches er mit Wasser zersetzte. Aus der α-Bromundecansäure, die er so erhielt, gewann er durch Behandlung mit Kalilauge die α-Oxy-decan-α-säure. Diese kristallisiert in Nadeln von F:69° aus Petroläther oder Chloroform, ihr Äthylester F:33°.

Unsere Undecanolsäure hat F:161°, ihr Methylester F:102°. Während die synthetische Säure von *Bagard* ihrem Schmelzpunkt nach sicher in die homologe Reihe der α-Oxycarbonsäuren hineinpaßt, ist der Schmelzpunkt unserer Oxydecansäure weitaus höher als der der Cerebronsäure mit 25 Kohlenstoffen. Wir werden daher die Konstitutionsermittlung der neuen Säure fortsetzen und die auffällige Differenz aufzuklären suchen.

Da die von uns gefundene[2]) erste Phosphor-Schwefelverbindung, welche aus Cerebronsäure, Colamin, Glycerin, Schwefelsäure und Phosphorsäure besteht, von uns *Hirnsäure* benannt wurde, nennen wir die, eine *kohlenstoffärmere* Oxysäure, die Oxydecansäure, enthaltende neue Verbindung, welche aus Oxydecansäure, Colamin, Glycerin, Schwefelsäure und Phosphorsäure besteht, *Hypohirnsäure.*

Darstellung der weißen Materie.

Menschenhirne wurden von den Hirnhäuten befreit, mit fließendem Wasser blutfrei gewaschen, in der Fleischmaschine zerkleinert und im Vakuumtrockenschrank[3]) bei 35° und 10 mm Hg getrocknet.

Die getrocknete und auf einer Seckmühle zwischen geriffelten Metallwalzen fein gemahlene Masse wurde in dem von *Walter L. Halle* angegebenen[4]) Metall-Soxhletapparat 3 Tage mit Aceton, dann in demselben Apparat mit niedrig siedendem Petroläther (Fraktion bis 55°) extrahiert.

Das mit Petroläther erschöpfte Pulver wurde an der Luft von Petroläther befreit und hierauf mehrmals mit Äthylalkohol bis zur Erschöpfung extrahiert. Der Alkohol wurde aus dem Kolben sofort durch Faltenfilter und Heißdampftrichter filtriert. Beim Erkalten fiel aus dem Alkohol die weiße Materie aus. Nach zweitägigem Stehen

[1]) Bulletins de l'Acad. fr. 4, 1, 310, 348.
[2]) *S. Fränkel* und *O. Gilbert*, l. c.
[3]) *S. Fränkel*, diese Zeitschr. 74, 170, 1916.
[4]) *W. L. Halle*, ebendaselbst 36, 245, 1911.

wurde der Niederschlag abgesaugt, mehrmals mit Alkohol gewaschen, im Vakuum über Chlorcalcium getrocknet und endlich in einem Soxhletapparat 2 Tage mit Äther extrahiert. Hierauf wurde der in Äther unlösliche Anteil mehrmals aus heißem Alkohol umgelöst, bis die Abscheidung rein weiß wurde. Der Niederschlag wurde abgesaugt, mit Alkohol und zuletzt mit Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Verarbeitung der weißen Materie.

Die gereinigte weiße Substanz wurde in reinem Methylalkohol auf schwach siedendem Wasserbad gelöst und mit heißer methylalkoholischer Ätzbarytlösung so lange versetzt, bis nichts mehr ausfiel und die überstehende Lösung deutlich alkalisch reagierte.

Nach dem Erkalten wurde filtriert, der Niederschlag scharf abgesaugt und nacheinander mit Methylalkohol, Äthylalkohol und Wasser gewaschen. Die Fällung wurde in Wasser suspendiert und durch mehrere Stunden unter häufigem Reiben Kohlensäure eingeleitet, bis die Reaktion sauer wurde. Hierauf wurde die Flüssigkeit abgesaugt, die Fällung mit Wasser und dann mit Alkohol gewaschen und zwecks Entfernung der Sphingogalaktoside oftmals mit siedendem Äthylalkohol ausgeholt, bis der Rückstand keine Orcinreaktion mehr zeigte, wodurch die Abwesenheit von Sphingogalaktosiden im Rückstand erwiesen wurde. Aus dem erkaltenden Alkohol schieden sich die Cerebroside als weiße Pulver ab.

Der kohlehydratfreie Rückstand wurde bis zur Erschöpfung mit heißem Benzol extrahiert. Der in das Benzol übergehende Anteil der Substanz ist bereits in einer Arbeit von *S. Fränkel* und *O. Gilbert*[1]) beschrieben worden.

Durch Zentrifugieren und scharfes Absaugen wurde der in Benzol unlösliche Anteil gewonnen. Er erwies sich als in organischen Lösungsmitteln unlöslich. Er wurde im Vakuum über Paraffin vom Benzol befreit, mit verdünnter Salzsäure verrieben und nach längerem Stehen filtriert. Diese Operation wurde so lange wiederholt, bis im Filtrat kein Barium mehr nachgewiesen werden konnte. Dann wurde der Rückstand mit kaltem Wasser und Alkohol chlorfrei gewaschen.

Der bariumfreie Rückstand wurde in heißem Benzol gelöst und mit kaltem Methylalkohol versetzt. Am nächsten Tage war ein feinkristallinischer Niederschlag gefallen. Diese Umfällung wurde zweimal wiederholt. Die Substanz war in heißem Äthylalkohol löslich und wurde aus möglichst kleinen Mengen desselben vier- bis fünfmal umkristallisiert. Aus den vereinigten Mutterlaugen wurde nach Einengen im Vakuum

[1]) *S. Fränkel* und *O. Gilbert*, diese Zeitschr. **124**, 206, 1921.

noch eine zweite Kristallfraktion gewonnen. Es wurde scharf abgesaugt, mit kaltem Alkohol und Äther gewaschen und im Vakuum getrocknet.

Beschreibung des erhaltenen Körpers.

Der Körper ist in kalten organischen Lösungsmitteln unlöslich, löslich aber in heißem Äthylalkohol und heißem Benzol. Schon nach wenigen Augenblicken trübt sich die erhaltene Lösung, weshalb eine Bestimmung der optischen Aktivität nicht ausgeführt wurde.

Der Körper ist rein weiß und von feinkristallinischer Struktur. Die mikroskopische Untersuchung zeigte radiär angeordnete Nadeln, die bei gekreuzten Nicols deutlich aufleuchteten.

Schmelzpunkt, mit einem Normalthermometer bestimmt, 196°. Die Substanz enthält Stickstoff (nach *Lassaigne* nachgewiesen), Schwefel und Phosphor (in der Soda-Salpeterschmelze als Schwefelsäure und Phosphorsäure nachgewiesen).

Analyse:

Kohlenstoff — Wasserstoff, mikroanalytisch nach *Pregl*.

5,520 mg Substanz: 12,915 mg CO_2 und 3,896 mg H_2O
6,381 „ „ 15,022 „ CO_2 „ 4,566 „ H_2O
5,996 „ „ 14,112 „ CO_2 „ 4,432 „ H_2O

Stickstoff, nach *Dumas-Pregl*.

19,822 mg Substanz: 0,36 ccm N (14°, 748 mm)
22,889 „ „ 0,39 „ N (16°, 748 „)
25,311 „ „ 0,51 „ N (17°, 739 „)
25,733 „ „ 0,52 „ N (16°, 739 „)

Schwefel,

nach *Carius-Pregl*: 19,375 mg Substanz: 23,955 mg $BaSO_4$,
„ *Liebig*: 24,463 „ „ 30,290 „ $BaSO_4$.

Phosphor, nach der Methode der Säuregemischveraschung von *Neumann*:

25,728 mg Substanz: 12,915 mg $Mg_2P_2O_7$
21,415 „ „ 12,293 „ $Mg_2P_2O_7$
23,602 „ „ 12,702 „ $Mg_2P_2O_7$

Gesamtanalyse:

		C	H	N	P	S	
$C_{101}H_{152}N_3PSO_{26}$.	Ber.:	64,30	8,06	2,23	1,64	1,67	Proz.
	Gef.:	63,80	7,90	2,13	1,40	1,70	„
		64,20	8,01	1,98	1,60	1,70	„
		64,19	8,27	2,33	1,50		„
				2,35			„

Molekulargewichtsbestimmung, nach der Mikro-Camphermethode von *Rast*:

6,274 mg Substanz in 73,190 mg Campher: . 1,8° Depression.
Molekulargewicht: Ber. 1885
Gef. 1905

Der Aminostickstoff wurde nach der Mikromethode von *van Slyke* bestimmt.

21,893 mg Substanz: 0,42 ccm N (16°, 736 mm), entsprechend 2,15 Proz. Aminostickstoff.

NH_2-N. Ber.: 2,23 Proz.
Gef: 2,15 „

Die Substanz war also ein Triamino-Monophosphormonosulfatid, welches eine Aminobase enthalten mußte. *Sämtlicher Stickstoff der Substanz war in Form von Aminogruppen vorhanden.*

Basische Hydrolyse.

Der neue Körper wurde in heißem Methylalkohol gelöst und mit überschüssiger methylalkoholischer Ätzbarytlösung einen Tag lang gekocht, filtriert und mit Methylalkohol gewaschen.

A. Lösung. In die Lösung wurde Kohlensäure eingeleitet, erwärmt und das ausgeschiedene Bariumcarbonat abfiltriert. Dann wurde mit Bleiessig gefällt, filtriert, das überschüssige Blei mit Schwefelwasserstoff gefällt und abfiltriert, der Schwefelwasserstoff mit Kohlensäure verjagt. Der Bleiniederschlag war kohlenstofffrei. Die Lösung wurde auf ein ganz kleines Volumen eingeengt, mit absolutem Alkohol aufgenommen, die alkoholische Lösung im Vakuum eingeengt und diese Operation so lange wiederholt, bis die Lösung hochprozentig alkoholisch geworden war.

Dann wurde mit 30proz. alkoholischer Goldchloridlösung ein Goldsalz gefällt, welches sich als das Goldsalz des *Aminoäthylalkohols* erwies. Die Kristalle wurden abfiltriert und aus Wasser umkristallisiert. Nadeln vom Schmelzpunkt 188 bis 190°.

18,377 mg Substanz:	8,990 mg Au			
25,334 „ „	0,81 ccm N (16°, 736 mm)			
C_2H_7ON, HCl, $AuCl_3$.	Ber.:	49,12 Proz. Au	3,49 Proz. N	
	Gef.:	48,92 „ Au	3,66 „ N	

B. Wasserunlöslicher Anteil. Dieser Anteil wurde mit verdünnter Salzsäure von Barium befreit, mit Wasser bariumfrei und chlorfrei gewaschen und in Äther aufgenommen. Die ätherische Lösung wurde verdunstet und der Rückstand in möglichst wenig heißem absoluten Alkohol gelöst. Die alkoholische Lösung wurde mit Tierkohle gekocht, heiß filtriert und im Vakuum in der Kälte kristallisieren gelassen. Der erhaltene schön kristallinische weiße Körper wurde mehrmals aus absolutem Alkohol umkristallisiert.

α-Oxydecansäure.

Wir erhielten eine Substanz vom Schmelzpunkt 161°, die mit konzentrierter Natronlauge eine schnell vergängliche Rotfärbung gab. Die Substanz erwies sich bei der Prüfung mittels der Reaktion von Lassaigne als stickstofffrei.

Analyse:

6,694 mg Substanz:	15,656 mg CO_2	und	6,433 mg H_2O
7,728 „ „	18,070 „ CO_2	„	7,321 „ H_2O

$C_{10}H_{20}O_3$.	Ber.:	63,78 Proz. C	10,71 Proz. H
	Gef.:	63,79 „ C	10,75 „ H
	•	63,77 „ C	10,0 „ H

Die Acidität wurde durch Titration mit n/100 Natronlauge, mit Phenolphthalein als Indikator in siedend alkoholischer Lösung bestimmt

0,2126 g Substanz: 11,0 ccm n/100 NaOH.

Molekulargewicht für $C_{10}H_{20}O_3$ Ber.: 188

Gef.: 193

Der Körper war optisch inaktiv.

a-Oxydecansäuremethylester.

Die Säure wurde durch vierstündiges Kochen mit Methylalkohol, der 1 Proz. Chlorwasserstoff enthielt, verestert. Das Reaktionsprodukt wurde in Wasser gegossen, die Abscheidung filtriert und zweimal aus absolutem Methylalkohol umkristallisiert. Schmelzpunkt 102°, weiße Schuppen.

Analyse:

22,374 mg Substanz: 53,490 mg CO_2 und 21,195 mg H_2O.

$C_{11}H_{22}O_3$.	Ber.:	65,38 Proz. C	10,89 Proz. H
	Gef.:	65,20 „ C	10,60 „ H

O-Acetyl-a-Oxydekansäuremethylester.

Der Ester wurde mit 10 Teilen Essigsäureanhydrid und 1 Teil im Silbertiegel umgeschmolzenen Natriumacetats unter Zusatz von etwas Eisessig 6 Stunden auf dem Ölbad bei 120° acetyliert. Das Reaktionsprodukt wurde in Eiswasser ausgegossen, filtriert, mit Methylalkohol bis zum Verschwinden des Essigsäuregeruchs gekocht und in Äther aufgenommen. Der Äther wurde im Vakuum verdunstet und der Rückstand zweimal aus Äthylalkohol umkristallisiert. Schmelzpunkt 123°, weiße Blättchen.

Analyse:

17,884 mg Substanz: 41,570 mg CO_2 und 15,665 mg H_2O.

$C_{13}H_{25}O_4$.	Ber.:	63,67 Proz. C	10,20 Proz. H
	Gef.:	63,39 „ C	9,80 „ H

Nun wurde versucht, Salze dieser Oxysäure darzustellen. Zu diesem Zwecke wurde die Substanz in heißem Wasser suspendiert, Natronlauge e natrio zugesetzt, mit verdünnter Schwefelsäure genau neutralisiert und mit Silbernitrat bzw. Bariumacetat gefällt.

a-Oxydekansaures Silber.

Weiße, feinkristallinische Schuppen, bei gekreuzten Nicols stark aufleuchtend. Schmilzt nicht.

11,301 mg Substanz: 4,125 mg Ag.

$C_{10}H_{19}O_3Ag$.	Ber.:	36,58 Proz. Ag
	Gef.:	36,50 „ Ag

α-Oxydekansaures Barium.

Bariumsalz: Weiße Blättchen, aus wässerigem Alkohol umkristallisiert. Sintert bei etwa 205⁰.

8,282 mg Substanz: 3,744 mg $BaSO_4$.
$(C_{10}H_{19}O_3)_2Ba$. Ber.: 26,86 Proz. Ba
Gef.: 26,61 „ Ba

Konstitutionsbestimmung der Säure $C_{10}H_{20}O_3$.

Zwecks Konstitutionsbestimmung der gefundenen Säure wurde eine Oxydation mit gleichzeitiger CO_2-Abspaltung nach der von *Levene* und *Jacobs* modifizierten Methode von *Edmed* ausgeführt[1]).

Etwa 0,3 g des schmelzpunktreinen Körpers wurden in 1proz. Kalilauge suspendiert und erwärmt, bis sich eine Gelatine gebildet hatte. Diese wurde nun mit heißer Kaliumpermanganatlösung (4,5 g $KMnO_4$ in 1 Liter) bedeckt und am Wasserbad bis zur Braunfärbung erhitzt. Die Oxydation ging sehr rasch und glatt vonstatten. Dann wurde Natriumbisulfit zugesetzt, in Äther aufgenommen, verdunstet, mit Alkohol ausgeholt und rasch durch einen Heißdampftrichter filtriert. Aus der alkoholischen Lösung schied sich beim Erkalten das Oxydationsprodukt aus. Aus der Mutterlauge wurde nach Einengen im Vakuum eine neuerliche Fraktion gewonnen.

Die Mutterlauge wurde nochmals ausgeäthert, doch hinterblieb beim Verdunsten des Äthers kein Rückstand. Die Oxydation war also quantitativ verlaufen.

Das Oxydationsprodukt wurde zweimal aus absolutem Alkohol umgefällt. Es entwickelte, mit Alkohol und konzentrierter Schwefelsäure in der Eprouvette erhitzt, einen eigenartigen Fruchtgeruch, der auf die vermutete *Pelargonsäure* hindeutete[2]).

Zur Identifizierung der Säure als Pelargonsäure wurden ihre Salze nach Angaben von *O. Grossmann*[3]) dargestellt. Die Seifen wurden mit verdünnter Schwefelsäure zerlegt, mehrmals mit Äther ausgeschüttelt und die ätherische Lösung verdunstet. Dann hinterblieb eine weiche Masse von ranzigem Geruch. Es wurde genau mit Ammoniak neutralisiert und aus der gebildeten Lösung das Silber-, Blei- und Bariumsalz gefällt.

Silbersalz, mit Silberacetat gefällte, äußerst voluminöse weiße Masse.
19,312 mg Substanz: 7,860 mg Ag.
$C_9H_{17}AgO_2$. Ber.: 40,75 Proz. Ag
Gef.: 40,70 „ Ag

---

1) *Edmed*, Journ. Chem. Soc. **73**, 627, 1898; *Levene* und *Jacobs*, Journ. of biol. Chem. **12**, 385, 1912.

2) *Castellana*, R. A. L. (5) **14**, 1, 467.

3) *Grossmann*, Ber. **26**, 643, 1893.

Bariumsalz, mit Bariumacetat gefällte weiße Blättchen.

21,816 mg Substanz: 11,388 mg $BaSO_4$.

$(C_9H_{17}O_2)_2Ba$. Ber.: 30,43 Proz. Ba
Gef.: 30,72 „ Ba

Bleisalz, weiße Schuppen.

20,453 mg Substanz: 12,102 mg $PbSO_4$.

$(C_9H_{17}O_2)_2Pb$. Ber.: 39,70 Proz. Pb
Gef.: 40,41 „ Pb

Saure Hydrolyse.

3 g Substanz wurden unter Rückflußkühlung 9 Stunden am Ölbad mit 25proz. Salzsäure bei 110° gekocht. Nach dem Erkalten wurde mehrmals mit Äther ausgeschüttelt und geschieden.

A. Wässerige Schicht. Die wässerige Lösung wurde mit Bleiessig gefällt, Alkohol zugesetzt, nach längerem Stehen das auskristallisierte Bleichlorid abfiltriert, mit einem Körnchen Silbercarbonat durchgeschüttelt, filtriert, das Silber durch einige Blasen Schwefelwasserstoff gefällt, filtriert und zur Vertreibung des Schwefelwasserstoffs Kohlensäure durchgeleitet.

Dann wurde aus drei Proben der Lösung ein Goldsalz, ein Platinsalz und ein Pikrat dargestellt, um den *Aminoäthylalkohol* $NH_2 . CH_2 . CH_2 . O$ zu identifizieren.

Goldsalz, mit alkoholischer Goldchloridlösung gefällt. Nadeln vom Schmelzpunkt 189°.

26,312 mg Substanz: 12,893 mg Au.

$C_2H_7ON, HCl, AuCl_3$. Ber.: 49,08 Proz. Au
Gef.: 49,00 „ Au

Platinsalz, mit alkoholischer Platinchloridlösung gefällt, gelbe Blättchen.

22,431 mg Substanz: 8,232 mg Pt.

$2 C_2H_7ON, 2 HCl, PtCl_4$. Ber.: 36,64 Proz. Pt
Gef.: 36,70 „ Pt

Pikrat, mit alkoholischem, pikrinsaurem Natrium aus höchst konzentrierter alkoholischer Lösung gefällt. Gelbe Nadeln vom Schmelzpunkt 159,5°.

8,520 mg Substanz: 0,14 ccm N (14°, 743 mm).

$C_2H_7ON . C_6H_3N_3O_7$. Ber.: 19,31 Proz. N
Gef.: 19,23 „ N

Dieses Pikrat wurde bisher nur indirekt dargestellt[1]). Die Gesamtmenge des ausgefällten Colamins betrug 0,27 g, entsprechend 9 Proz. des Ausgangsmaterials.

In einem Teile der ursprünglichen ausgeätherten salzsauren Lösung wurden Schwefelsäure mit Chlorbarium, Phosphorsäure mit Ammonmolybdat nachgewiesen.

[1]) *Gabriel*, Ber. **21**, 570, 1888.

Der Hauptteil der Lösung wurde dazu verwendet, um das vermutete *Glycerin* nachzuweisen. Die Lösung wurde am Wasserbad bis zur Sirupkonsistenz eingeengt und dann das Glycerin abdestilliert. Zu diesem Zwecke wurde eine Wasserdampfdestillation im Vakuum nach der Methode des preußischen Militärversuchsamtes[1]) ausgeführt, welche in unserem Laboratorium während des Krieges umgearbeitet wurde. Unter Einleiten von überhitztem Wasserdampf wurde abdestilliert und aus der erhitzten Vorlage das mit übergegangene Wasser durch einen mit warmem Wasser gefüllten Kühler abgeblasen. Das Colamin ging als Chlorhydrat natürlich nicht mit über. Es wurde eine Flüssigkeit von süßem Geschmack gewonnen, die sich als Glycerin erwies. Es wurden 0,57 g Glycerin, entsprechend 19 Proz. des Ausgangsmaterials, gewonnen. Der Nachweis des Glycerins wurde folgendermaßen durchgeführt:

Ein Teil der Lösung wurde mit Kaliumbisulfat auf dem Wasserbad eingekocht und dann in eine mit Wasser beschickte Vorlage trocken überdestilliert. Acroleingeruch trat auf. Die erhaltene Acroleinlösung rötete fuchsinschweflige Säure, gab die Silberspiegelreaktion und gab mit Nitroprussidnatrium und Piperidin eine enzianblaue Färbung, die mit Ammoniak violett und mit Eisessig blaugrün wurde[2]).

Schließlich wurde mit Benzoylchlorid und 10proz. Natronlauge nach *Schotten-Baumann* das Tribenzoat dargestellt. Es zeigte, aus Ligroin umkristallisiert, den Schmelzpunkt 76°[3]), welcher dem Glycerintribenzoat entspricht.

B. Ätherische Schicht. Die ätherische Lösung wurde eingedunstet. Der Rückstand wurde aus absolutem Alkohol zweimal umkristallisiert. Der gewonnene Körper zeigte den Schmelzpunkt 161° und war mit der bei der basischen Hydrolyse gefundenen Säure vollkommen identisch, auch optisch inaktiv, wahrscheinlich also racemisiert. Die Menge der gewonnenen Säure betrug 1,1 g, entsprechend 36,6 Proz. des Ausgangsmaterials.

---

1) *K. Fleischer*, Zeitschr. f. analyt. Chem. **60**, 330, 1922.
2) *Lewin*, Ber. **32**, 3388, 1899.
3) *Piloty*, Ber. **30**, 3167, 1897.

Versuche zur Prüfung der Wielandschen Atmungstheorie.

Von

Kanichi Tanaka.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 26. Februar 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

In *Wielands* Atmungstheorie[1]) sind zwei voneinander verschiedene Annahmen zu unterscheiden, die Dehydrierungstheorie und die Theorie der Wasserstoffaktivierung. Die erste Theorie versucht allgemein, den Mechanismus der Oxydationsvorgänge zu erklären, die zweite Theorie führt eine spezielle Hypothese ein, die den Mechanismus der biologischen Oxydation betrifft.

Nach der Dehydrierungstheorie besteht die Oxydation organischer Körper nicht in einer Sauerstoff*aufnahme*, sondern in einer Wasserstoff*abgabe*. Nach der Theorie der Wasserstoffaktivierung reagiert in der atmenden Zelle der Wasserstoff der organischen Moleküle unmittelbar mit dem molekularen Sauerstoff, nach der Gleichung:

$$\begin{matrix}-H\\-H\end{matrix} + O_2 = H_2O_2,$$

die wir als die *Traube-Wieland*sche Gleichung[2]) bezeichnen wollen.

Es gibt heute keine Möglichkeit, bei Gegenwart von Wasser zwischen Sauerstoffaufnahme und Wasserstoffabgabe zu unterscheiden, weder in einfachen chemischen Systemen, noch weniger in den komplizierteren biologischen Systemen. Deshalb ist die Dehydrierungstheorie zunächst eine Schreibweise, die man da anwenden mag, wo sie bequem erscheint.

Anders steht es mit der Theorie der Wasserstoffaktivierung, die experimentell geprüft werden kann. Ist sie wahr, so muß es gelingen, unter geeigneten Bedingungen das Primärprodukt der Atmung, das

---

[1]) Vgl. hierzu *O. Warburg*, diese Zeitschr. **142**, 518, 1923; **152**, 479, 1924.

[2]) *Moritz Traube*, Gesammelte Abhandlungen. Berlin, Meyer und Müller, 1899. *H. Wieland*, Ergebn. d. Physiol. **20**, 477, 1922; Oppenheimers Handb. d. Biochem., 2. Aufl., **2**, 252, 1923.

Wasserstoffperoxyd, nachzuweisen. Von diesem Gesichtspunkt aus habe ich, auf Vorschlag von Herrn *Otto Warburg*, die im folgenden beschriebenen Versuche unternommen, die zum Teil Modellversuche mit Palladiumschwarz, zum Teil Versuche mit lebenden Zellen sind.

1. Die Herstellung der Palladiumpräparate

geschah durch Reduktion von Palladiumchlorürlösungen mit Ameisensäure in der von *Wieland* beschriebenen Weise[1]). Das so gewonnene Schwarz enthält immer reichlich Wasserstoff und ist wenig brauchbar für gasanalytische Messungen. Um den Wasserstoff zu entfernen, leitete ich, nachdem das Präparat durch Dekantieren auf dem Wasserbad chlorfrei gewaschen war, 12 Stunden einen Strom von Sauerstoff durch die wässerige Palladiumsuspension, wobei der Wasserstoff oxydiert und das Metall mit Sauerstoff gesättigt wurde. Dann saugte ich auf der Nutsche ab und trocknete im Vakuumexsikkator. So hergestellte Präparate sind von großer katalytischer Wirksamkeit und eignen sich, da sie in wässeriger Suspension beim Schütteln mit Luft weder Gas aufnehmen noch abgeben, vortrefflich für gasanalytische Versuche.

2. Anordnung der Modellversuche.

Das Palladiumschwarz wurde in Mengen von Zehntel-Milligrammen oder Milligrammen in Gefäße von der Form der Abb. 1 gebracht. Das Volumen der eingefüllten Flüssigkeit betrug 10 ccm, das Volumen des Gasraums etwa 20 ccm. Die Gefäße wurden in oft beschriebener Weise mit Barcroftmanometern verbunden und im Thermostaten so schnell geschüttelt, daß Gas- und Flüssigkeitsphase zu jeder Zeit nahezu im Absorptionsgleichgewicht waren. Aus den an den Manometern abgelesenen Drucken ergab sich die Geschwindigkeit der chemischen Reaktionen, von denen ich die Knallgasreaktion, die Wasserstoffperoxydzersetzung und die Alkoholoxydation näher untersucht habe.

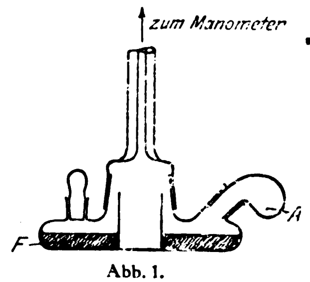


Abb. 1.

Obwohl die Palladiumpräparate bei ihrer Herstellung mit 100proz. Sauerstoff gesättigt worden waren, erwies sich Sauerstoff von Atmosphärendruck als störend bei Untersuchung der katalytischen Wirkungen, eine Erscheinung, die wahrscheinlich mit Adsorptionsverdrängungen zusammenhängt. Brauchbare Resultate erhielt ich erst, als ich mit dem Sauerstoffdruck auf etwa $^1/_5$ Atm. herunterging.

---

[1]) Chem. Ber. 45, 484, 1912.

3. Die Knallgasreaktion an Palladium.

Moritz Traube[1]) hat gezeigt, daß beim Schütteln von Palladium mit Knallgas Wasserstoffperoxyd auftritt. *Traube* erhielt nur einen kleinen Teil der berechneten Menge an Wasserstoffperoxyd, weil, wie er nachwies, Palladium gleichzeitig Wasserperoxyd zerstört.

Es liegt nahe, die Ausbeute an Wasserstoffperoxyd dadurch zu steigern, daß man den Palladiumsuspensionen Stoffe zusetzt, die die Wasserstoffperoxydspaltung hemmen, die Knallgasreaktion aber nicht oder nur wenig. Ein solcher Stoff ist, wie ich gefunden habe, Blausäure, gelöst in n/10 Schwefelsäure. n/500 Blausäure, gelöst in n/10 Schwefelsäure, hemmt die Knallgasreaktion nur um etwa 5 Proz., die Wasserstoffperoxydspaltung dagegen fast vollkommen. Zum Beleg des Gesagten teile ich zwei Protokolle mit (Tabellen I und II).

Tabelle I.
Knallgasreaktion an Palladium. 20°. Gasraum 20 Proz. Wasserstoff in Luft.

	1	2
	0,25 mg Pd 5 ccm n/10 H_2SO_4 Gasraum 24 ccm Gefäßkonstante 2,1	0,34 mg Pd 5 ccm n/10 H_2SO_4, in bezug auf HCN 2×10^{-3} normal Gasraum 25 ccm Gefäßkonstante 2,2
	Beobachtete Druckänderung in mm	
In 10 Minuten	— 44	— 45
„ 10 „	— 44	— 45
„ 10 „	— 45	— 45
„ 10 „	— 44	— 44
„ 5 „	— 22	— 22
In Summa mm .	— 199	— 201
„ „ cmm .	417	440
H_2O_2 im Zentrifugat	$0,4 \times 10^{-6}$ Mole, äquivalent 9 cmm O_2 und 9 cmm H_2	5×10^{-6} Mole, äquivalent 112 cmm O_2 und 112 cmm H_2
Zur Wasserbildung verbrauchter Sauerstoff	$^1/_3$ (417 — 18) = 133 cmm	$^1/_3$ (440 — 224) = 72 cmm

Aus Tabelle I geht hervor, daß nach 45 Minuten in der Knallgasreaktion übertragen sind:

in der blausäure*freien* Lösung durch 0,25 mg Palladium 142 cmm Sauerstoff;

in der blausäure*haltigen* Lösung durch 0,34 mg Palladium 184 cmm Sauerstoff,

d. h. pro Milligramm Palladium und 45 Minuten im ersten Falle 570, im zweiten Falle 540 cmm Sauerstoff, oder in Blausäure nur 5 Proz. weniger.

---

[1]) Ges. Abhandl., S. 530.

Tabelle II.

Wasserstoffperoxydspaltung an Palladium. 17°. Gasraum Luft.

		1	2
Hauptraum		0,40 mg Pd 5 ccm n/10 H_2SO_4 ohne HCN Gasraum 25,8 ccm $k_{O_2} = 2{,}45$	0,68 mg Pd 5 ccm n/10 H_2SO_4 2×10^{-3} n in bezug auf HCN Gasraum 29,4 ccm $k_{O_2} = 2{,}78$
In der Ansatzbirne		0,48 × 10^{-4} Mole H_2O_2, gelöst in 0,5 ccm	
Nach Zugabe des H_2O_2 aus der Birne	in 5 Min.	+ 35 mm	
	„ 5 „	+ 29 „	
	„ 5 „	+ 26 „	
	„ 20 „	+ 59 „	
	„ 20 „	+ 34 „	Nach 60 Min. + 3 mm
	Summe	+ 183 mm = 450 cmm. Berechnet für totale Zersetzung des H_2O_2: 540 cmm	

Aus Tabelle II geht hervor, daß die gleiche Blausäurekonzentration unter sonst gleichen Bedingungen die Wasserstoffperoxydspaltung praktisch vollkommen hemmt.

Waren die Druckmessungen beendigt, so wurde das Palladium aus den Suspensionen abzentrifugiert, die überstehende Flüssigkeit (10 ccm) in ein Kolorimeterröhrchen übergeführt, 0,5 ccm Titansäurereagens[1]) zugefügt und die auftretende Gelbfärbung mit Färbungen verglichen, die bekannte Mengen von Wasserstoffperoxyd hervorbrachten. War die Schichthöhe 10 cm, so konnten 10^{-7} Mole Wasserstoffperoxyd, gelöst in 10 ccm, noch erkannt werden.

An dem Schluß der Tabelle I ist angegeben, wieviel Wasserstoffperoxyd bei der Knallgasreaktion in den Zentrifugaten gefunden wurde. In der blausäurefreien Lösung hatten von 142 cmm absorbierten Sauerstoffs 9 cmm Wasserstoffperoxyd gebildet, in der blausäurehaltigen Lösung hatten von 184 cmm absorbierten Sauerstoffs 112 cmm Wasserstoffperoxyd gebildet. Die Ausbeute an Wasserstoffperoxyd steigt also bei Zugabe der Blausäure von 6 auf 61 Proz. Nach diesem Ergebnis ist kein Zweifel mehr daran möglich, daß die *Traube*sche Formulierung der Knallgasreaktion an Palladium zutreffend ist.

4. Die Alkoholoxydation an Palladium.

Davy und *Döbereiner*[2]) haben gefunden, daß Äthylalkohol an Platinmetallen durch Sauerstoff oxydiert wird, wobei Aldehyd und Essigsäure entstehen.

---

[1]) Nach *Treadwell*, Qualitative Analyse.

[2]) *Döbereiner*, Gilberts Ann. d. Phys. **72**, 193, 1822; **74**, 269, 1823.

Wieland nimmt an, daß hierbei das Palladium den Wasserstoff des Alkohols aktiviert, so daß der molekulare Sauerstoff ihn angreift, und daß die eigentliche Oxydation, wie bei der Knallgasreaktion, nach der Gleichung

$$\begin{matrix}-H\\-H\end{matrix} + O_2 = H_2O_2$$

verläuft.

Ist dies wahr, so sollte es möglich sein, bei der Oxydation des Alkohols Wasserstoffperoxyd nachzuweisen. Es sei bemerkt, daß die Trennung von Alkoholoxydation und Wasserstoffperoxydspaltung mit Hilfe von Blausäure *nicht* gelingt, beide Vorgänge werden in ungefähr gleichem Maße von Blausäure gehemmt. Immerhin aber sollte auch hier, wie bei der Knallgasreaktion ohne Blausäure, Wasserstoffperoxyd nachweisbar sein.

Ich habe die Alkoholoxydation an Palladium unter den verschiedensten Bedingungen untersucht und immer die Zentrifugate, nachdem große Mengen an Sauerstoff verbraucht waren, mit Titanschwefelsäure auf Wasserstoffperoxyd geprüft, aber niemals eine positive Reaktion erhalten, weder blausäurefrei, noch bei Gegenwart von Blausäure, weder bei 37 noch bei 20⁰, weder in neutraler noch in stark saurer Lösung (vgl. z. B. Tabelle III).

Tabelle III.

Alkoholoxydation an Palladium. 37⁰. Gasraum Luft.

	1	2	3	4
mg Pd	2,48	2,67	2,84	3,86
Eingefüllte Flüssigkeit	5 ccm 5 Gew.-Proz. Alkohol in n/10 H_2SO_4			
Normalität in bezug auf HCN	—	2×10^{-6}	2×10^{-4}	2×10^{-3}
Volumen des Gasraums, ccm	25	24	25	24
k_{O_2}	2,2	2,1	2,2	2,1
	Beobachtete Druckänderung in mm			
In 15 Minuten	— 35	— 43	— 14	— 1
„ 15 „	— 35	— 43	— 14	— 1
„ 15 „	— 35	— 44	— 15	— 1
„ 15 „	— 37	— 47	— 15	0
„ 15 „	— 36	— 43	— 13	0
Summe mm	— 178	— 220	— 71	
Summe cmm O_2 verbraucht	393	460	156	
Summe Mole O_2 verbraucht	$1,8 \times 10^{-5}$	$2,1 \times 10^{-5}$	$0,7 \times 10^{-5}$	
Titanreaktion in den Zentrifugaten	negativ	negativ	negativ	

Wenn *Wieland*, wie es nach seinen zusammenfassenden Darstellungen scheint, bei derselben Reaktion Wasserstoffperoxyd gefunden hat, so möchte ich das darauf zurückführen, daß er stets

mit Wasserstoff „angeätztes“ Palladium verwendete. In der Tat muß er dann, wie der vorhergehende Abschnitt lehrt, Wasserstoffperoxyd finden, doch hat dieser Befund mit der Alkoholoxydation nichts zu tun.

Die Tatsache, daß man die Reaktion

$$\begin{matrix}-H \\ -H\end{matrix} + O_2 = H_2O_2, \qquad (1)$$

wie sie bei der Knallgasreaktion tatsächlich stattfindet, durch Blausäure von der Wasserstoffperoxydspaltung trennen kann, die Alkoholoxydation aber nicht, scheint mir wichtig zu sein und dafür zu sprechen, daß der Alkoholoxydation und der Peroxydspaltung ähnliche Vorgänge zugrunde liegen. Was die Peroxydspaltung anbetrifft, so ist sicher, daß sie *nicht* nach dem Schema der *Traube-Wieland*schen Gleichung erfolgt, da sonst für jedes verschwindende Peroxydmolekül ein neues entstehen müßte. Vielmehr wird man die Peroxydspaltung als Oxydation des Peroxyds durch ein Palladiumoxyd auffassen, und in ähnlicher Weise möchte ich die Oxydation des Alkohols an Palladium auf die Wirkung eines Palladiumoxyds zurückführen.

5. Die Methylenblaureduktion.

Nach *Bredig* und *Sommer*[1]) beschleunigen Platinmetalle die Reaktion zwischen gewissen organischen Stoffen und Methylenblau, wobei das Methylenblau zu Methylenweiß reduziert, der andere Teilnehmer der Reaktion oxydiert wird. Bilanzmäßig betrachtet, spielt hier das Methylenblau die Rolle eines Oxydationsmittels, es „ersetzt“, wie *Wieland* sich ausdrückt, den Sauerstoff.

In allen Fällen, in denen man den molekularen Sauerstoff in der Bilanz durch Methylenblau ersetzen kann, sieht *Wieland* den Beweis für erbracht, daß der molekulare Sauerstoff nach der Gleichung

$$\begin{matrix}-H \\ -H\end{matrix} + O_2 = H_2O_2$$

reagiert, eine, wie es scheint, durch nichts begründete Schlußfolgerung.

Schüttelt man eine neutrale Cysteinlösung mit molekularem Sauerstoff, so wird Cystein zu Cystin oxydiert. „Ersetzt“ man den molekularen Sauerstoff durch Methylenblau, indem man beispielsweise m/100 neutrale Cystein- und m/1000 Methylenblaulösung unter Abschluß von Sauerstoff stehen läßt, so wird das Cystein gleichfalls, nunmehr „sauerstofflos“, oxydiert. *Wieland* würde daraus schließen, daß die Reaktion im ersten Falle nach der Gleichung verläuft:

$$\begin{matrix}-SH \\ -SH\end{matrix} + O_2 = \begin{matrix}S \\ S\end{matrix} + H_2O_2.$$

[1]) Zeitschr. f. physikal. Chem. **70**, 34, 1910.

während die Untersuchung des Falles gezeigt[1]) hat, daß nicht die SH-Gruppe des Cysteins, sondern das als Verunreinigung der Lösungen vorhandene Eisen mit dem molekularen Sauerstoff reagiert.

Hier wie in jedem anderen Falle ist es unerlaubt, aus dem Mechanismus einer Reaktion A auf den Mechanismus einer Reaktion B zu schließen. So wahr es ist, daß der molekulare Sauerstoff in der Bilanz einer Oxydation oft durch Methylenblau ersetzt werden kann, so wenig sagt dieser Umstand etwas aus über den Weg, auf dem der molekulare Sauerstoff reagiert.

6. Versuch mit lebenden Zellen.

Am Beispiel der Knallgasreaktion wurde gezeigt, wie man intermediär gebildetes Wasserstoffperoxyd vor der Zersetzung schützen und dann als Hauptprodukt der Oxydation nachweisen kann. Das Verfahren erlaubt, überall da etwa gebildetes Wasserstoffperoxyd zu fassen, wo die Peroxydspaltung empfindlicher gegen Blausäure ist als der Oxydationsvorgang.

Unter den vielen Fällen von Zelloxydationen, die in diesem Institut untersucht worden sind, gibt es *einen*, in dem die Atmung durch Blausäure nicht gehemmt wird, die Atmung der Chlorella, während die Wasserstoffperoxydspaltung der Chlorella durch Blausäure zum Verschwinden gebracht wird. Oxydation und Wasserstoffperoxydspaltung können hier mit Hilfe von Blausäure vollständiger getrennt werden, als im Falle der Knallgasreaktion.

Ist die *Wieland*sche Atmungstheorie wahr, ist also die Primärreaktion der Atmung wirklich

$$\begin{matrix}-H\\-H\end{matrix} + O_2 = H_2O_2,$$

so muß die Chlorella bei Gegenwart von Blausäure eine dem Sauerstoffverbrauch äquivalente Menge an Wasserstoffperoxyd liefern.

Für meine Versuche benutzte ich Chlorellamengen von 24 mg Trockensubstanz. Suspendiert man diese Zellmenge in 10 ccm *Knop*scher Lösung[2]) und fügt 0,5 ccm einer 0,15 molaren Wasserstoffperoxydlösung hinzu, so ist bei 20° das Peroxyd nach einer Stunde zersetzt[3]) und in der abzentrifugierten Lösung mit Titanschwefelsäure nicht

[1]) *O. Warburg* und *S. Sakuma*, Arch. f. d. ges. Physiologie **200**, 203, 1923 und *S. Sakuma*, diese Zeitschr. **142**, 68, 1923.

[2]) Da Phosphat die Titanreaktion des Wasserstoffperoxyds stört, so habe ich in allen meinen Versuchen *Knop*sche Lösung ohne Phosphat verwendet. Die Zusammensetzung der *Knop*schen Lösung findet man bei *Warburg* und *Negelein*, Zeitschr. f. physikalische Chem. **102**, 235, 1922.

[3]) Näheres über die Wasserstoffperoxydspaltung in Chlorella bei *Warburg* und *Uyesugi*, diese Zeitschr. **146**, 486, 1924.

mehr nachweisbar. Wiederholt man den Versuch mit dem Unterschied, daß man vor Zugabe der Zellen $^1/_{100}$ Mol Blausäure pro Liter *Knop*scher Lösung zusetzt, so findet man nach einer Stunde in dem Zellzentrifugat das gesamte zugesetzte Peroxyd wieder. n/100 Blausäure hemmt also die Wasserstoffperoxydspaltung durch Chlorella vollkommen.

Andererseits hemmt die gleiche Blausäurekonzentration die Atmung der Chlorella nicht, sondern beschleunigt sie sogar. Läßt man nun 0,24 mg Zellsubstanz, suspendiert in 10 ccm *Knop*scher Lösung, eine Stunde lang *im Dunkeln* atmen, zentrifugiert dann und fügt zu dem Zentrifugat Titanschwefelsäure, *so fällt die Reaktion negativ aus*, obwohl das Titan weniger als den hundertsten Teil der nach dem Sauerstoffverbrauch berechneten Wasserstoffperoxydmenge anzeigen würde (vgl. Tabelle IV).

Tabelle IV.

Atmung der Chlorella in Blausäure. 20°. Gasraum Luft. *Dunkel.* Im Einsatz keine Kalilauge[1]).

Chlorella, Trockengewicht . .	24 mg	24 mg
Phosphatfreie *Knop*sche Lösung	10 ccm	10 ccm
In bezug auf HCN	—	m/100
Volumina, ccm	$v_F = 10$ $v_g = 20$	$v_F = 10$ $v_g = 10$
Gefäßkonstanten	$k_{O_2} = 1{,}89$ $k_{CO_2} = 2{,}74$	$k_{O_2} = 1{,}81$ $k_{CO_2} = 2{,}06$
	Beobachtete Druckänderung in mm	
	h	h
Nach 80 Minuten . . .	— 28	— 67
O_2 verbraucht, cmm .	162	380
O_2 verbraucht, Mole .	$0{,}73 \times 10^{-5}$	$1{,}7 \times 10^{-5}$
Titanreaktion in 10 ccm Zentrifugat	negativ	negativ
Empfindlichk. d. Titanreaktion in 10 ccm .	10^{-7} Mole	10^{-7} Mole
Es kann an H_2O_2 höchstens entstanden sein		$\frac{10^{-7}}{1{,}7 \times 10^{-5}} = 0{,}6$ Proz.

Hieraus folgt, daß die *Traube-Wieland*sche Reaktion

$$\begin{matrix}-H\\-H\end{matrix} + O_2 = H_2O_2$$

entweder in dem Vorgang der Atmung überhaupt nicht erfolgt oder, wenn man sich streng an die Tatsachen halten will, höchstens in einem für die Atmung belanglosen Maße.

---

[1]) Enthält der Einsatz keine Kalilauge, so berechnet sich der Sauerstoffverbrauch x_{O_2} nach der Formel:

$$x_{O_2} = h\left[\frac{k_{CO_2} \cdot k_{O_2}}{k_{CO_2} + \gamma k_{O_2}}\right],$$

wo k_{O_2} und k_{CO_2} die Gefäßkonstanten für Sauerstoff und Kohlensäure bedeuten, γ den respiratorischen Quotienten und h die beobachtete Druckänderung (vgl. *O. Warburg*, diese Zeitschr. **152**, 51, 1924), γ kann für die Atmung der Chlorella gleich — 1 gesetzt werden.

7. Entstehung von Wasserstoffperoxyd bei Belichtung der Chlorella.

Anhangsweise sei über Versuche berichtet, bei Belichtung blausäurehaltiger Chlorellen Peroxyd nachzuweisen, das etwa bei der Photoreduktion der Kohlensäure entstehen und durch die Blausäure vor weiterem Zerfall geschützt werden könnte.

Belichtet man Chlorella in phosphatfreier *Knop*scher Lösung, die in bezug auf Blausäure n/100 ist, so tritt in der Tat in die *Knop*sche Lösung reichlich Wasserstoffperoxyd über, das sich hier bis zu Konzentrationen von n/1000 anhäufen kann[1]). Eine nähere gasanalytische Untersuchung der Erscheinung hat jedoch ergeben, daß es sich *nicht* um ein Zwischenprodukt der Kohlensäureassimilation handelt, sondern um ein Produkt der *Photooxydation* des Chlorophylls. Denn es wird, während sich das Peroxyd bei der Belichtung bildet, keine entsprechende Menge *Kohlensäure*, sondern eine entsprechende Menge *Sauerstoff* verbraucht. Die Photooxydation des Chlorophylls verläuft also nach der *Traube-Wieland*schen Gleichung, wie es überhaupt scheint, daß unphysiologische Oxydationsvorgänge, z. B. die Oxydationen in anaerob lebenden Zellen[2]), wenn man sie mit Sauerstoff zusammenbringt, oft Wasserstoffperoxyd liefern.

---

[1]) Deshalb müssen die im vorigen Abschnitt beschriebenen Versuche bei Abschluß von Licht ausgeführt werden.

[2]) Vgl. *McLeod* und *Gordon*, Biochem. Journ. **16**, 499, 1922; *Avery* und *Morgan*, Journ. of exper. Med. **39**, 275. New York 1924.

Über das Vorkommen und Verhalten der Sulfatase in menschlichen Organen.

VI. Mitteilung über Sulfatase.

Von

L. Rosenfeld (Charkow).

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 24. Januar 1925.)

Nach den Untersuchungen *Neubergs* und seiner Mitarbeiter findet sich in Mikroorganismen, insbesondere in dem Pilze Aspergillus oryzae, ein Ferment vor, das imstande ist, die Ätherschwefelsäuren in die Komponenten zu zerlegen gemäß der Gleichung: $R.O.SO_3K + H_2O = ROH + KHSO_4$. Das Enzym hat wegen dieser Wirkung den Namen *Sulfatase* erhalten (1923). Das Vorkommen der typischen aromatischen Ätherschwefelsäuren ist auf den Tierkörper beschränkt; die im Pflanzenreich beobachteten Schwefelsäureverbindungen besitzen, soweit bisher bekannt ist, einen anderen Bau. Die Ätherschwefelsäuren werden vom tierischen Organismus durch eine Reaktion erzeugt, die als eine chemische Abwehrmaßregel bezeichnet werden kann; denn im allgemeinen zeigen die gepaarten Ätherschwefelsäuren eine geringere Giftigkeit als die aromatischen Paarlinge, die sich an ihrem Aufbau beteiligen. Schon den Entdeckern der Ätherschwefelsäuren, *E. Baumann* und *E. Salkowski*, war die große Beständigkeit dieser Verbindungen gegenüber biologischen Agenzien aufgefallen, und so ist es verständlich, daß mehr als 40 Jahre verstrichen sind, bis ein auf die genannte Körperklasse eingestelltes Ferment, eben die Sulfatase, aufgefunden worden ist. Die Überlegung, daß die auf physiologischem Wege gebildeten komplexen Verbindungen in der Natur auch wieder in ihre einfachen Bestandteile aufgelöst werden müßten, hatte dazu geführt, zunächst bei den Mikroorganismen nach der Sulfatase zu fahnden; denn es war zu erwarten, daß die mit dem Harn ausgeschiedenen gepaarten Schwefelsäuren durch den natürlichen Kreislauf

schließlich mit Kleinlebewesen in Berührung treten und von diesen mineralisiert werden.

Aber wie so oft, hat die Erfahrung auch in diesem Falle gelehrt, daß das Problem schließlich einfacher liegt, indem an den Stätten der Bildung auch die Agenzien der Zerlegung anzutreffen sind. Wie *C. Neuberg* und *E. Simon*[1]) bereits gezeigt haben, enthalten tatsächlich die tierischen Gewebe, und zwar Leber, Niere, Gehirn und Muskel von Kaninchen und Meerschweinchen das Ferment, das Äthersulfate zerlegt. Die Genannten haben festgestellt, daß die tierische Sulfatase auf die Kaliumsalze der Phenolschwefelsäure, p-Kresolschwefelsäure und Indoxylschwefelsäure einwirkt.

Die Bildung der Ätherschwefelsäuren als Ausdruck einer antitoxischen Funktion der Organe ist nun von großer Bedeutung für den Menschen. Phenol-, p-Kresol- und Indoxyl-schwefelsäure sind regelmäßige Bestandteile des normalen Harns. Die im Darmkanal bei der Eiweißfäulnis entstehenden Phenole sowie das Indol werden resorbiert und durch eine entsprechende Umwandlung zu den Äthersulfaten im Körper entgiftet. Es war daher zu erwarten, daß auch im *menschlichen Organismus* die Sulfatase nicht fehlen würde. Untersuchungen hierüber waren jedoch nicht überflüssig; denn es hat sich gezeigt, daß für den Chemismus selbst hoch entwickelter Tiere, beispielsweise in der Purinreihe, grundsätzliche Unterschiede bestehen, indem die Purinbasen beim Menschen und den Menschenaffen zu Harnsäure, bei den nicht anthropoiden Affen, beim Hunde und Kaninchen zu Allantoin abgebaut werden[2]). Ähnliche Differenzen machen sich bei der Umsetzung der Methylpurine[3]) und der Verarbeitung des Guanins[4]) geltend.

Auf *Sulfatase* wurden vorläufig folgende menschliche Organe geprüft: Niere, Gehirn, Leber, Duodenum, Nebenniere, Milz, Lunge, Muskel, Dünndarm und Pankreas. Die Wirkungsstärke der genannten Organe entsprach unter den herrschenden Verhältnissen der angegebenen Reihenfolge. Ob dieselbe noch eine Änderung erfahren wird, z. B. bei Variation des Milieus, läßt sich nicht voraussagen, zumal auch naturgemäß nur Teile von Leichen untersucht werden konnten, die ein ungleiches Alter besaßen und von Personen stammten, die verschiedenen Krankheiten erlegen waren.

---

[1]) *C. Neuberg* und *E. Simon*, diese Zeitschr. **156**, 365, 1925; vgl. *C. Neuberg*, Die Naturwissenschaften **12**, 797, 1924.

[2]) *W. Wiechowski*, diese Zeitschr. **25**, 431, 1910; *S. J. Tannhauser* und *A. Bommes*, H. **91**, 336, 1914.

[3]) *M. Krüger* und *P. Schmidt*, Ber. **32**, 2677, 1899.

[4]) *A. Schittenhelm*, H. **46**, 354, 1905; **66**, 54, 1910; *W. Jones* und *C. R. Austrian*, H. **48**, 110, 1906.

Auffallend ist zunächst die hohe Spaltungskraft des menschlichen Gehirns. Es darf im Hinblick darauf daran erinnert werden, daß das Gehirn normaliter Ätherschwefelsäuren enthält, die Sulfatide; diese gehören jedoch einem anderen Typus an als die Äthersulfate. und es kann deshalb kein Zusammenhang zwischen beiden Tatsachen behauptet werden.

Die Versuchsanordnung wurde folgendermaßen gestaltet:

Für 100 ccm einer rund 1 proz. Lösung von phenolätherschwefelsaurem Kalium wurden 20 g feuchtes, gut zerkleinertes Organ angewendet. Zur Aufrechterhaltung der neutralen Reaktion, die zur Vermeidung unspezifischer Zersetzungen des Äthersulfats erforderlich ist, dienten nach *C. Neuberg* und *E. Simon* (l. c.) 3 g Calciumcarbonat, außerdem wurden pro 100 ccm Lösung 2 ccm Toluol benutzt. Das Gemisch, von dem öfter auch ein Mehrfaches der angegebenen Mengenverhältnisse hergestellt wurde, blieb unter häufigem Umschütteln bei 37° im Brutschrank stehen. Zur Kontrolle wurde im Thermostaten gleichzeitig stets eine 1 proz. Lösung von phenolätherschwefelsaurem Kalium für sich digeriert. In keinem Falle vermochte ich eine Selbstspaltung des Salzes zu beobachten.

Weiter wurde zur Kontrolle immer ein Ansatz mit denselben Organen gemacht, indem an Stelle der 1 proz. Lösung von phenolschwefelsaurem Kalium einfach Wasser trat. Aus den Organen selbst ging keine in ihnen präformierte Ätherschwefelsäure in die Lösung über. Etwa vorhandene anorganische Sulfate stören nicht, da ich in allen Fällen nicht die Menge frei gewordener Sulfat-ionen ermittelte, sondern die Bestimmung des ungespalten gebliebenen Quantums Ätherschwefelsäure vornahm. Zu diesem Zwecke verfuhr ich folgendermaßen.

10,0 ccm des Gemischs wurden mit 10 ccm alkalischer Barytmischung ausgefällt. Das in einem Meßkolben befindliche Gemenge wurde mit Wasser auf 50,0 ccm gebracht. Nach rund 12stündigem Stehen wurde abfiltriert und in dem klaren, aber manchmal durch Eiweiß etwas opak getrübten, jedenfalls aber von Bariumsulfat freien Filtrat (40,0 ccm) durch Kochen mit Salzsäure die restierende Menge ungespaltener Phenolschwefelsäure festgestellt. Durch zweistündiges Kochen auf kleiner Flamme gelang es ausnahmslos, das Bariumsulfat in kristallinischer Form zu gewinnen. Dasselbe wurde abfiltriert, in gewohnter Weise ausgewaschen und nach dem Glühen zur Wägung gebracht.

Die erhaltenen Resultate sind in nachstehender Tabelle wiedergegeben. Zu dieser sei noch folgendes bemerkt.

Aus der Anfangsbestimmung, die unmittelbar nach Herstellung des Gemisches von phenolätherschwefelsaurem Salze mit Organ ausgeführt wurde, ergibt sich der ursprüngliche Gehalt an organisch gebundener Schwefelsäure. Fortlaufend wird dann zu den in der Tabelle angegebenen Zeiten die Abnahme an Äthersulfat verzeichnet. Diese zeigt den Grad der Spaltung an, der in die Tabelle als Mittelwert von je zwei Bestimmungen eingetragen ist. Wie man gewahr wird, ist die Zerlegung nach 10 Tagen im wesentlichen abgelaufen und schreitet dann in weiteren 8 Tagen verhältnismäßig langsam fort. Weiter sieht

man, daß unter den gewählten Bedingungen Niere und Gehirn einen erheblichen Vorsprung vor den anderen Organen in ihrem Hydrolysierungsvermögen besaßen.

Für die Überlassung der Leichenteile sage ich dem Direktor des pathologischen Instituts der Charité sowie des Kreiskrankenhauses Lichterfelde besten Dank. Ich bemerke, daß alle Organe von Männern stammten, die teils durch Selbstmord, teils infolge eines Schlaganfalls verstorben waren.

Nr.	Organ	Prozent. Spaltung von phenolschwefelsaurem Kalium bei 37° nach				
		2 Tagen	4 Tagen	6 Tagen	10 Tagen	18 Tagen
1	Niere	4,56	14,20	17,20	23,35	26,78
2	Gehirn	10,61	17,15	18,76	24,30	26,58
3	Leber.	3,76	11,01	15,32	17,22	18,55
4	Duodenum . . .	—	9,65	—	15,34	15,84
5	Nebenniere . . .	2,64	6,22	8,48	11,40	12,43
6	Milz	—	8,22	—	11,14	11,14
7	Lunge	1,05	4,32	3,50(?)	9,37	11,08
8	Muskel	1,98	3,97	4,90	5,92	7,55
9	Dünndarm . . .	—	2,76	—	6,90	7,18
10	Pankreas	1,85	2,02	3,17	5,56	5,83

Über den Chemismus der Salvarsanwirkung in vitro und vivo[1]).

Von

Josef Schumacher (Berlin).

(Eingegangen am 26. Februar 1925.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

Schon *Paul Ehrlich* fand bekanntlich, daß Lösungen von intaktem Salvarsan auf die Spirochäten in vitro keinen abtötenden Einfluß besitzen. *Krantz* gelang es sogar, Spirochäten in verdünnten Neosalvarsanlösungen zu züchten. Weiterhin konnte der Nachweis geführt werden, daß dieses Verhalten des intakten Salvarsans offenbar darauf beruht, daß es von der lebenden Zelle nicht gebunden wird.

Versuch 1. Man versetzt 5 ccm einer 10proz. Hefesuspension[2]) mit der gleichen Menge einer 2proz. Neosalvarsan*leitungswasser*lösung, wodurch eine 1proz. Neosalvarsanlösung auf die Zelle zur Einwirkung kommt. Alsdann wird 1 Stunde stehengelassen. Darauf wird in der Zentrifuge Neosalvarsan frei gewaschen[3]), was je nach der verwendeten Menge von Hefezellen kürzere oder längere Zeit erfordert. Spätestens bei der 16. bis 18. Waschung war die Hefe aber praktisch neosalvarsanfrei geworden. Die gewaschene Hefe wurde alsdann mit einigen Kubikzentimetern destillierten Wassers aufgeschüttelt und mit der gleichen Menge 1proz. ammoniakalischer $AgNO_3$-Lösung[4]) versetzt.

---

[1]) Aus einem Vortrag, gehalten am 17. November 1924 vor der Berl. Mikrobiol. Ges.: „Über die chemische Zusammensetzung des Bakterienkerns und zur Chemie der Desinfektion".

[2]) 10 g käufliche Hefe wurden in der Reibschale vorsichtig mit 90 ccm destillierten Wassers zu einer gleichmäßigen Suspension verarbeitet. Wurde an Stelle von destilliertem Wasser physiologische Kochsalzlösung genommen, so waren die Versuchsergebnisse ungefähr die gleichen.

[3]) Probe mit ammoniakalischer $AgNO_3$-Lösung oder mit Osmiumsäure.

[4]) 1 g $AgNO_3$ wurde in 5 ccm destillierten Wassers gelöst und so lange tropfenweise Ammoniak zugegeben, bis gerade Auflösung des Niederschlags erfolgte. Darauf wurde mit Aqua dest. auf 100 aufgefüllt. Das sonst zum Neosalvarsannachweis verwendete Albargin habe ich hier absichtlich vermieden, da es schon eine braune Eigenfarbe besitzt und die Beurteilung der eventuell eintretenden Brauntönung der Hefesuspension dadurch möglicherweise beeinträchtigt worden wäre.

Resultat: Die zurückgebliebene Hefe war, makroskopisch betrachtet, leicht hellbraun gefärbt (Abb. 10)[1]. Im hängenden Tropfen untersucht, findet man ungefähr ein Drittel aller Hefezellen *tief braun* gefärbt, die übrigen Zellen aber absolut *farblos*, wie unvorbehandelte Hefezellen. Streicht man die so gewonnene Hefe auf Objektträger aus, fixiert in der Flamme und färbt ganz kurz mit einer Malachitgrünlösung 1 : 10000 nach, so findet man, wie wir gleich noch sehen werden, alsdann die toten Hefezellen tief schokoladenbraun gefärbt, die *ehemals* lebenden Zellen, die inzwischen durch die Behandlung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung abgetötet worden sind, hellgrün tingiert, wodurch wir gleichzeitig eine Methode in der Hand haben, in einer Kultur jeweils die Menge der bereits abgestorbenen und noch lebenden Keime festzustellen[2].

In einem weiteren Versuch wurde zu beweisen versucht, daß die sich in Versuch 1 tiefbraun färbenden Exemplare wirklich tote Hefezellen waren.

Versuch 2. Zu diesem Zwecke werden die Hefezellen zuvor mit *Alkohol* abgetötet und alsdann mit Neosalvarsan behandelt, wie im vorigen Versuch die lebenden Hefezellen. Es waren alsdann erhebliche Unterschiede zu konstatieren. Einmal ließ sich solche abgetötete Hefe schwerer neosalvarsanfrei waschen als die lebenden Zellen, des weiteren war des Zentrifugat nach der Behandlung mit der $AgNO_3$-Lösung nicht farblos bis hellbraun, sondern dunkelbraun gefärbt. Mikroskopisch waren *alle Zellen* tief schokoladenbraun tingiert, woraus wir den Schluß ziehen können, daß die in gewöhnlichen Kulturen das Neosalvarsan bindenden Zellen tatsächlich abgestorbene Exemplare sind.

Wählt man zu dem gleichen Versuch statt des Neosalvarsans eine mit destilliertem Wasser bereitete und alkalisierte Altsalvarsanlösung 1 : 500, so erhält man ähnliche Befunde. Nur findet man hier die mit Salvarsan behandelte Hefe meist etwas brauner gefärbt als bei dem entsprechenden Neosalvarsanversuch (Abb. 8). Anfänglich alkalisierten wir die Altsalvarsanlösungen aus der Hand, indem wir so viel 15proz. Natronlauge zugaben, bis die ausgefällte Base wieder in Lösung gegangen war. Da wir aber hierbei auch manchmal Hefe erhielten, die nach der Salvarsanbehandlung etwas brauner gefärbt war, manchmal auch heller braun wurde als bei einem anderen ent-

---

[1] Die Brauntönung der Hefe war bei verschiedenen Neosalvarsanproben nicht immer die gleiche. Sie schwankte von beinahe farblos bis hellbraun. Bei Verwendung von destilliertem Wasser zur Bereitung der Neosalvarsanlösung ist die Hellbrauntönung der Hefe noch viel geringer, da durch die Calciumgegenwart im Leitungswasser bereits etwas Base in Freiheit gesetzt wird und diese von den Zellipoiden aufgenommen wird, worauf weiter unten noch zurückgekommen wird.

[2] Demonstriert auf der Würzburger Mikrobiologentagung, Juni 1922. Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Orig. 89, 207.

sprechenden Versuch und wir uns zuerst diesen differenten Versuchsausfall nicht erklären konnten, gingen wir genauer vor. Dabei zeigte sich, daß man sowohl verschiedene Resultate erhält, wenn man selbst gleiche Mengen Natriumhydroxyd nimmt, sofern man dieses einmal der Altsalvarsanlösung in einem Zuge, das andere Mal tropfenweise zusetzt[1]), als auch, wenn man etwas Alkaliüberschuß anwendet. Je mehr das Alkali dominierte, um so heller braun waren die mit diesen Salvarsanlösungen behandelten Zellen.

Versuch 1a. Man gibt zu 50 ccm Altsalvarsanlösung 1 : 500 die erforderliche Menge 15proz. NaOH (0,19 ccm) auf einmal, schüttelt um und gibt darauf 50 ccm 10proz. wässeriger Hefesuspension zu. Nachdem 1 Stunde stehengelassen wurde, zentrifugiert man die Hefe ab und wäscht sie 15mal in der Zentrifuge mit destilliertem Wasser ordentlich aus. Schüttelt man alsdann die Hefe mit 5 ccm Wasser auf und gießt die gleiche Menge 1proz. ammoniakalischer Silbernitratlösung zu, so wird die Hefe *dunkelbraun. Mikroskopisch* erkennt man den *größten Teil der Hefezellen farblos, weiß*, einen kleinen Teil hellbraun tingiert und die wenigen toten Exemplare tiefbraun gefärbt.

Versuch 1b. Verfährt man hierbei wie in Versuch 1a beschrieben und gibt der Altsalvarsanlösung aber tropfenweise langsam das Natriumhydroxyd zu, bis gerade die Base maximal ausgefallen ist, und bringt sie alsdann durch weiteren Zusatz von Natriumhydroxyd wieder in Lösung, so ergibt sich bezüglich der Hefe sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch kaum ein Unterschied. Dennoch enthält diese Hefe etwas mehr Salvarsan gebunden als in Versuch 1a, wie sich aus der Prüfung der von der Hefe abzentrifugierten Flüssigkeit noch ergibt. Aber auch hier ist der größte Teil der Hefezellen mikroskopisch ungefärbt und erscheint absolut weiß.

Versuch 1c. Wie Versuch 1a, nur wurden der Altsalvarsanlösung 0,28 ccm 15proz. NaOH hinzugegeben. Bei diesem kleinen Alkaliüberschuß wird von der Hefe weniger Salvarsan gebunden als in den beiden anderen Versuchen, was sich einmal dadurch zeigt, daß diese Hefe nach der Behandlung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung nur *hell*braun wird und auch die von der Hefe abzentrifugierte Salvarsanlösung mehr Salvarsan enthält als in den beiden ersten Fällen. Mikroskopisch sind hier die meisten Hefezellen absolut farblos, weiß, ein kleiner Teil ganz schwach hellgelb, die toten Exemplare aber ebenfalls tiefbraun.

Verdünnt man die mit der Hefesuspension ursprünglich vermischte Salvarsanlösung nach Abzentrifugieren der Hefezellen mit etwa der drei- bis fünffachen Menge destillierten Wassers und gibt ammoniakalische Silbernitratlösung hinzu, so erkennt man an der verschieden stark auftretenden Braunfärbung der Altsalvarsanlösung (durch Reduktion des Silbernitrats), daß in Versuch 1c am wenigsten Salvarsan gebunden

---

[1]) Es ist ja bekannt, daß man im letzteren Falle etwas mehr Natriumhydroxyd gebraucht zur Alkalisierung der Altsalvarsanlösung als wenn man dies in einem Zuge zusetzt.

vorgefunden wurde, am meisten in Versuch 1b. Eine Mittelstellung nimmt Versuch 1a ein.

Die lebende Zelle tritt also offenbar mit dem intakten Salvarsanmolekül nicht in chemische Reaktion, mit Ausnahme vielleicht der wenigen hellbraun gefärbten Zellen, die einen anderen chemischen Aufbau besitzen müssen, wie die *größere Anzahl* der Hefezellen, von denen sie sich offenbar nur deshalb unterscheiden, weil sie sich in einem anderen Entwicklungsstadium befinden. Dies zeigt sich auch in einem verschiedenen Verhalten beider Zellarten bei der Zellfärbung. Ferner müssen wir aber berücksichtigen, daß dennoch Prozesse physikalisch-chemischer Natur bei der Einwirkung der Salvarsanlösungen auf die Hefe auftreten können. Etwa adsorbiertes Salvarsan oder Neosalvarsan wird aber ebenfalls aus dem allergrößten Teil der Zellen durch das Waschwasser entfernt, sonst müßte ja eine Bräunung *aller* Zellen bei der Nachbehandlung mit Silbernitrat eintreten. Auch einem weiteren Punkte dürfen wir unser Augenmerk nicht verschließen. Es wäre auch der Fall denkbar, daß es zu einer chemischen Reaktion von Zellbestandteilen mit dem Neosalvarsan gekommen wäre und daß diese an sich in Wasser unlöslichen Zellbestandteile nach ihrer Verbindung mit den Salvarsanen als wasserlösliche Produkte die Zelle verlassen hätten und auf diese Weise eine Schädigung dieser erfolgt wäre[1]).

Aus den Versuchen mit den Altsalvarsanlösungen kann man weiterhin den Schluß ziehen, daß um so mehr Altsalvarsan von den Zellen gebunden wird, je weniger das Phenolat in diesen Altsalvarsanlösungen vorherrscht, je näher man also dem Punkte kommt, wo die freie Salvarsanbase liegt[2]). Die mangelhafte Einwirkung des Salvarsans auf die Spirochäten und andere Mikroorganismen in vitro erklärt *Ehrlich* bekanntlich damit, daß das Salvarsan im Körper erst oxydativ umgewandelt werden müsse.

Die Ergebnisse unserer Untersuchungen, die wir in den letzten 10 Jahren angestellt haben und die an anderer Stelle ausführlich publiziert werden[3]), ergaben kurz folgenden Tatbestand: Während

---

[1]) Bei anderer Gelegenheit konnte ich aus Suspensionen von allerdings abgetöteten *Thymus*leucocyten in Neosalvarsan aus den Filtraten neosalvarsanhaltige Nucleoproteide isolieren.

[2]) Dieser letztere Befund wurde aber erst erhoben, nachdem längst beobachtet worden war, daß nur die freie Salvarsanbase elektiv von *allen* Zellen gespeichert wird, welche Tatsache wir nach der Durchsaugung der Luft durch die Altsalvarsanlösungen gefunden hatten. Erst als die Versuche mit den Altsalvarsanlösungen nicht mehr gleichmäßig ausfielen, wie oben schon betont, wurden diese Verhältnisse noch näher untersucht.

[3]) Arch. f. Dermat. u. Syph. 1925. Worauf beruht die spezifisch spirillocide Wirkung des Salvarsans?

eine frisch bereitete Salvarsanlösung von dem Gros der lebenden Hefezellen nicht gebunden wird, wie bereits betont, geschieht dies aber, wenn man eine Salvarsanlösung nimmt, die längere Zeit an der Luft gestanden oder durch die man einen nicht zu schwachen Luftstrom durchgeleitet hatte[1]).

Versuch 3. Man löst 0,3 Altsalvarsan in 300 ccm destillierten Wassers und gibt tropfenweise so viel 15proz. Natronlauge hinzu, bis die sich abscheidende Base gerade wieder gelöst hat. So hergestellte Altsalvarsanlösungen, durch die mit der Saugpumpe 1½ Stunden lang Luft durchgesaugt worden war, wobei sie sich trübten, wurden alsdann gut aufgeschüttelt auf die früher beschriebene Weise 1 Stunde lang auf lebende Hefezellen einwirken gelassen. Darauf wurden die Zellen wieder in der Zentrifuge salvarsanfrei gewaschen. Hierbei zeigte sich meistens, daß der Niederschlag verschwunden war, offenbar sich im Zellinhalt gelöst hatte. Die von den Zellen abzentrifugierte Flüssigkeit reduzierte meist gar nicht mehr sofort, sondern bräunte sich erst nach längerer Zeit noch etwas. Der größte Teil des Salvarsans war also von den Zellen offenbar gebunden worden. Alsdann wurde mit ammoniakalischer Silbernitratlösung versetzt. Dabei zeigte sich jetzt im Gegensatz zu der hellbraun gefärbten, mit intaktem Salvarsan behandelten Kontrollhefe, daß die Hefe jetzt *tief schwarzbraun* wurde, offenbar ganz bedeutend größere Mengen eines Salvarsanumwandlungsprodukts gebunden enthielt, als die Kontrollhefe, womit der obige Befund nur mehr geringer Salvarsanmengen in der abzentrifugierten Flüssigkeit korrespondierte. Mikroskopisch sind jetzt *alle* Hefezellen, im Gegensatz zu der Kontrolle, tiefbraun gefärbt (Abb. 9).

Durch die Berührung mit der Luft ist also ein Umwandlungsprodukt des Salvarsans entstanden, das jetzt eine *große* Affinität zur lebenden Zelle besitzt. Es wurde damals in erster Linie an ein Oxydationsprodukt gedacht, was aber nicht den Tatsachen entspricht. Offenbar wird zuerst durch die Einwirkung der Kohlensäure der Luft das vorhandene Phenolat[2]) zersetzt, wodurch die freie Salvarsanbase ausfällt, worauf *alsdann erst* sofort die Oxydationsprozesse der ausgefallenen Salvarsanbase einsetzen, die bekanntlich noch leichter oxydabel als das Dichlorhydrat ist, was man auch an der schmutzig grünlichen Verfärbung erkennt, die der Niederschlag nach einiger Zeit annimmt. Fernerhin machte ich schon vor einigen Jahren die Beobachtung[3]), daß frisch bereitete Salvarsanlösungen dennoch von den lebenden Zellen in mehr oder minder hohem Grade gebunden werden,

---

[1]) Mitgeteilt auf dem Kongreß der Deutsch. Derm. Ges. München 1923. Arch. f. Derm. u. Syph. **145**, 364, 1924.

[2]) Wie jetzt zu beweisen ist: Beim Durchleiten von CO_2 durch eine mit NaOH in das Dinatriumphenolat übergeführte Salvarsanlösung fällt sofort die gelbe Base aus.

[3]) Mitgeteilt in einer Diskussionsbemerkung zu *Jacobssohn*, Ver. f. inn. Med. Oktober 1921. Deutsch. med. Wochenschr. 1921, S. 1541.

wenn man ihnen verschiedene Salze der Alkalien oder Erdalkalien zusetzt.

Versuch 4. Wurde in den weiteren Versuchen das Neosalvarsan, ehe es, wie in Versuch 1, zu der Hefesuspension zugegeben wurde, statt in Leitungswasser in 1proz. Lösungen von KCl, NaCl, $NaHCO_3$, $CaCl_2$, Serum oder nucleinsaurem Natrium gelöst, so ergaben sich prinzipielle Unterschiede nicht. Auch hier war ein Teil der Zellen tief schokoladenbraun geworden, die lebenden Exemplare hatten auch hier kein Neosalvarsan gebunden. Doch waren offenbar die Mengen des von den Zellen gebundenen Neosalvarsans nicht die gleichen, insofern die toten Zellen am intensivsten gebräunt waren, wenn das Neosalvarsan in *Ringer*scher Lösung oder in Calciumchlorid gelöst worden war, was sich auch bereits makroskopisch in einer geringeren oder stärkeren Braunfärbung der abzentrifugierten Hefe dokumentierte. Gegenüber den Präparaten, die gewonnen worden waren durch Behandeln mit einer Neosalvarsanleitungswasserlösung, ergaben sich aber insofern Unterschiede, als hierbei im hängenden Tropfen auch einige Zellen beobachtet werden konnten, die eine schwache hellbraune Farbe angenommen hatten, daher etwas Neosalvarsan gebunden haben mußten.

Für beide zuletzt erwähnten Erscheinungen war damals eine Erklärung noch nicht zu geben. In Verfolgung dieser Dinge beobachteten wir dann späterhin, als wir weiterhin einen nicht zu schwachen Luftstrom durch eine mit Natronlauge alkalisierte Salvarsanlösung leiteten, daß sich die Salvarsanlösung je nach der verwendeten Menge rascher oder weniger rasch zu *trüben* begann. Bei Verwendung von 300 ccm 1prom. Salvarsanlösung lag dieser Zeitpunkt ungefähr bei 1¼ Stunden. Die Untersuchung dieses Niederschlages ergab, daß hierin die freie Salvarsanbase vorliegt, nicht etwa ein Oxydationsprodukt des Salvarsans. Dafür sprach außer der oben bereits erwähnten Zersetzung des in der alkalisierten Salvarsanlösung vorliegenden Phenolats durch die Kohlensäure der Luft, die praktisch vorhandene Unlöslichkeit des Niederschlags in Wasser, seine gute Löslichkeit in Alkohol und Alkalien, seine Unlöslichkeit in Benzol, sein Arsengehalt und seine Fähigkeit, in hohem Maße in Lecithinäther überzugehen. Der Niederschlag unterschied sich in nichts von frisch ausgefällter Salvarsanbase. Da wir in unserem erwähnten Vortrag (17. November 1924) den Nachweis erbringen konnten, daß nur solche organischen Substanzen basischer Natur von den Mikroorganismenzellen *elektiv* gebunden werden und dadurch eine Desinfektionswirkung zustande kommt, die *stärker* lipoid- bzw. lipoproteid- als wasserlöslich sind und die Salvarsanbase praktisch wasserunlöslich ist, die Hefezelle aber sowohl als auch die Spirochaeta pallida ein Lipoproteid[1]) enthalten, so war vorauszusehen, daß beide

[1]) *Schumacher*, Dermat. Wochenschr. 79, Nr. 46. 1924. Siehe auch ebendaselbst Nr. 45 und 47.

Mikroorganismen, die das intakte Salvarsan nicht zu binden vermögen, in hohem Grade die fast wasserunlösliche Salvarsanbase *elektiv* zu speichern vermögen. Das ist der Fall.

Versuch 5. Zentrifugiert man die aus einer Altsalvarsanlösung durch geeignete Zugabe von Na O H gerade ausgefällte und mit destilliertem Wasser gewaschene Salvarsanbase ab, bringt sie mit einer wässerigen Hefesuspension zusammen, schüttelt mehrmals und läßt 2 bis 3 Stunden stehen, wäscht darauf ordentlich mit destilliertem Wasser nach und behandelt alsdann die Zellen mit ammoniakalischer Silbernitratlösung, so bräunen sich die Zellen stark, als Zeichen, daß sie größere Mengen der Salvarsanbase gebunden haben. Mikroskopisch sind alle Zellen braun gefärbt (Abb. 9).

Da uns keine größeren Zellmengen bei der Spirochaeta pallida zur Verfügung stehen, können wir diesen Versuch an der Syphilisspirochäte in vitro nicht wiederholen[1]). Wir konnten aber das große Lösungsvermögen der Syphilisspirochäten für praktisch wasserunlösliche, aber stärker lipoproteid- als wasserlösliche Körper sehr schön am Beispiel der Viktoriablaubase demonstrieren.

Versuch 6. Man versetzt 10 ccm einer 1proz. wässerigen Lösung von Viktoriablau B mit ½ ccm 10proz. Sodalösung und wäscht die ausgefällte Base auf dem Filter ordentlich mit destilliertem Wasser. Darauf verreibt man auf dem Objektträger etwas Hefe mit einem Tropfen Wasser und gibt mit der Platinöse etwas von der dunkelrotbraunen Base hinzu und macht einen hängenden Tropfen. Man erkennt alsdann, daß sich die Hefezellen langsam *blau* färben und nach 24 Stunden fast sämtlich tief blau gefärbt erscheinen. Nimmt man statt Hefe rekurrenz- oder trypanosomenhaltiges Mäuseblut, das man mit etwas Viktoriablaubase verreibt, so bleiben Serum und rote Blutkörperchen ungefärbt. Nach einiger Zeit erkennt man nur das lipoproteidhaltige Protoplasma der weißen Blutkörperchen und die Parasiten *blau* gefärbt.

Infolge ihres Lipoproteidgehalts müssen die Syphilisspirochäten nach Verreiben von etwas Reizserum mit frisch ausgefällter Viktoriablaubase diese elektiv speichern. Sie färben sich alsdann *blau*, wenn auch ihrer Zartheit wegen nicht so intensiv wie die gröberen Rekurrensspirochäten. Die Blaufärbung beruht auf einer Salzbildung zwischen der Spirochätenlipoidsäure einerseits und der dunkel rotbraun gefärbten Viktoriablaubase andererseits. Wir müssen daher unseren bereits

---

[1]) Hier muß aber eine Beobachtung von *Krantz* (Münch. med. Wochenschrift 1922, S. 586 und 1598, ferner *Schumacher*, ebendaselbst 1923, S. 531) Erwähnung finden. *Krantz* prüfte bekanntlich das Verhalten der Syphilisspirochäten auf ihr Bindungsvermögen für Neosalvarsan mit der von mir für die Darstellung der Leucocytenkerne angegebenen Neosalvarsan-Albarginmethode. Er fand dabei, daß bei Verwendung älterer Neosalvarsanlösungen eine intensivere Bräunung der Spirochäten zustande kam als bei Verwendung von frisch bereiteter Neosalvarsanlösung. Auch er glaubte, ebenso wie ich seinerzeit und wie sämtliche Forscher seit *Ehrlich*, ein Oxydationsprodukt des Neosalvarsans hierfür verantwortlich machen zu müssen.

anderenorts niedergelegten vier Anforderungen[1]), die wir an ein brauchbares Chemotherapeutikum gegen Lues stellen müssen, eine fünfte hinzufügen: Das Mittel oder sein Umwandlungsprodukt in vivo muß in höherem Grade sich in den Zellipoproteiden zu lösen vermögen als in Wasser.

Die elektive Speicherung der Salvarsanbase durch die Spirochaeta pallida können wir aber am Tierkörper demonstrieren. Injizieren wir einem, mit Primäraffekt behafteten Tiere oder Menschen eine nicht zu kleine Salvarsandosis intravenös, machen uns dann nach einiger Zeit (nicht vor Ablauf einer Stunde) ein Spirochätenpräparat und behandeln dieses mit Osmiumsäure (*Lennhoff*) oder ammoniakalischer Silbernitratlösung nach (*Schumacher*), so bräunen bzw. schwärzen sich die in dem Präparat vorhandenen Spirochäten. Das Verdienst, diese Tatsache zuerst demonstriert zu haben, gebührt bekanntlich *Lennhoff*[2]). Behandelte er in einem anderen Falle Ausstriche des spirochätenhaltigen Reizserums syphilitischer, mit Salvarsan injizierter Kaninchen mit einem Gemisch von Ferricyankalium und Eisenchlorid, so konnte er infolge der reduzierenden Eigenschaften des von den Spirochäten gespeicherten Arsenobenzolderivats eine „Metallimprägnation" der Krankheitserreger erzielen.

---

[1]) Arch. f. Derm. u. Syph. **145**, 364 und „Zur Stovarsolfrage", Dermat. Wochenschr. **79**, 1119/20. Wir verlangten dort auf Grund unserer Untersuchungen über die Wirkung des Salvarsans, daß ein Chemotherapeutikum gegen Lues zumindest folgenden Anforderungen genügen muß:

1. Das Mittel muß imstande sein, mit der lebenden Spirochätenzelle in Reaktion treten zu können, mindestens muß aber sein Umwandlungsprodukt in vivo dazu befähigt sein.

2. Das Mittel muß sauerstoffraubende Eigenschaften besitzen, auf den Ablauf oxydativer Synthesen also *hemmend* einzuwirken vermögen, um dadurch die natürlich vorhandenen Unterschiede im chemischen Aufbau der Körper- und Spirochätenzelle nach Möglichkeit therapeutisch ausnützen zu können. Es muß also gerade eine *entgegengesetzte* Wirkung entfalten wie die indirekt wirkenden Metallsalze.

3. Sofern seine Wirkung auf der Sauerstoffentziehung beruht, besitzt es zweckmäßig *hochgradig reduzierende* Eigenschaften, durch die die oben genannte Wirkung verstärkt wird. Da die Sauerstoffentziehung, die die Arsenogruppe bei ihrer eintretenden Oxydation bewirkt, erfahrungsgemäß bereits zur Abtötung der Pallida ausreicht, sind starke reduzierende Eigenschaften eines Arsenpräparates *keine* conditio sine qua non.

4. Das Mittel muß möglichst ein Körper vorwiegend *basischer* Natur sein, darf also mehr oder minder stark saure Gruppen (carboxylierte, sulfurierte oder arsanilierte Körper) nicht enthalten, weil solche Präparate erfahrungsgemäß eine geringere Affinität zu der Spirochätenzelle besitzen als erstere.

[2]) *Lennhoff*, Arch. f. Dermat. **145**, 366, 1924.

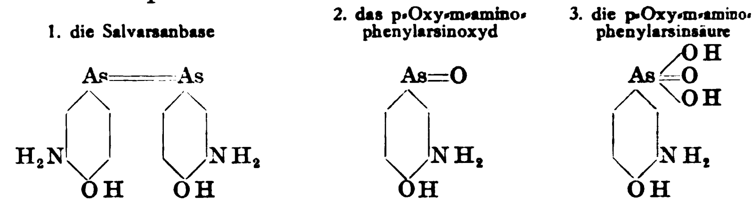
Wir haben nun den Nachweis zu führen, daß die Spirochäten nach einer Salvarsaninjektion die Salvarsan*base* gebunden enthalten. Aus dem Salvarsan:

As=As

ClH . H_2N NH_2 . HCl

OH OH

können im Körper entstehen:



Aus unseren Untersuchungen über Beziehungen zwischen chemischer Konstitution und pharmakologischer Wirkung geht andererseits hervor, daß mit der Veränderung der chemischen Konstitution gleichzeitig auch die physikalischen Eigenschaften eines Körpers weitgehend beeinflußt werden, daß in erster Linie durch Einführung saurer Gruppen, beispielsweise einer —COOH- oder $-SO_3H$-Gruppe, die Lipoidlöslichkeit ganz erheblich abnimmt bzw. verschwindet.

Versuch 7. Fuchsin, das sich beim Schütteln mit einer ½ proz. Lecithinätherlösung als außerordentlich stark lipoidlöslich erweist, verliert diese Eigenschaften in dem $-SO_3$-Gruppen tragenden Säurefuchsin, dementsprechend zeigt Fuchsin schwach antiseptische Eigenschaften, die dem Säurefuchsin bekanntlich fehlen[1]).

[1]) Die Lipoidlöslichkeit des Fuchsins und die Lipoidlöslichkeit des Säurefuchsins waren schon *Ehrlich* und *Overton* bekannt, auch *Eisenberg* erwähnt sie in einer Arbeit (Centralbl. f. Bakt. **71**, 471, 1913). Nach *Hailer* spielt die chemische Konstitution bei anorganischen und organischen Stoffen im übrigen eine Rolle nur insofern sie das physikalische Verhalten des Stoffes in der Lösung, nämlich die Quellwirkung, Oberflächenspannung, Lipoidlöslichkeit, katalytische Kraft beeinflußt. Mit der Veränderung der *chemischen* Konstitution wird daher, ebenfalls nach unseren Untersuchungen, gleichzeitig auch die *physikalische Eigenschaft* eines Körpers verändert. Die zwischen chemischer Konstitution und pharmakologischer Wirkung eines Stoffes beobachteten Zusammenhänge sind daher größtenteils Beziehungen zwischen den *physikalischen* Eigenschaften dieses Stoffes und seiner pharmakologischen Wirkung. Bisher ist aber meines Wissens noch nicht darauf hingewiesen worden, daß die *Carboxylierung* oder *Monosulfurierung* eines organischen Stoffes der aromatischen Reihe die Lipoidlöslichkeit desselben *verringert*, eine *mehrfache* Sulfurierung diese aber *vernichtet* und damit parallel gehend auch dessen desinfizierende Eigenschaften beeinflußt werden. Beispiel: Schwach erhaltene Lipoidlöslichkeit des monosulfurierten Alkaliblaus 3B, aufgehoben im mehrfach sulfurierten Wasserblau.

Ähnlich wie durch die Einführung einer $-COOH$- oder $-SO_3H$-Gruppe die Lipoidlöslichkeit auch ungefärbter Verbindungen (Phenol) herabgesetzt wird, schwindet diese auch durch eine *Arsanilierung* des Phenols. Aus diesem Grunde ist die p-Oxy-m-aminophenylarsinsäure fast absolut lipoidunlöslich geworden, wovon man sich überzeugen kann, wenn man ihre wässerige Lösung mit Lecithinäther schüttelt und mit ammoniakalischer Silbernitratlösung versetzt. Infolge ihrer Lipoidunlöslichkeit wird die p-Oxy-m-aminophenylarsinsäure auch nicht mehr von den Lipoproteiden der Spirochäten in vitro gebunden, weshalb ihr auch ebenda eine spirochätocide Wirkung fehlt und fehlen *muß*.

Versuch 8. Man bereitet sich zu diesem Versuch eine wässerige Lösung des Natriumsalzes der p-Oxy-m-aminophenylarsinsäure, indem man 2 g der Säure zu 100 ccm Wasser gibt und einen geringen Überschuß über die berechnete Menge Natriumhydroxyd hinzufügt, damit schwach alkalische Reaktion vorhanden ist. Bringt man nun zu einer 10proz. wässerigen Suspension von Hefezellen die gleiche Menge der Lösung des eben hergestellten Natriumsalzes oder die gleiche Menge einer gesättigten, wässerigen Lösung der *freien* Säure, läßt 1 Stunde stehen und wäscht alsdann ordentlich in der Zentrifuge, so reduzieren die Hefezellen nicht mehr im geringsten ammoniakalische Silbernitratlösung. Die p-Oxy-m-aminophenylarsinsäure als auch ihr Natriumsalz sind zu wenig lipoproteidlöslich, um von den Lipoidproteiden der Hefezelle noch elektiv aus der wässerigen Lösung heraus gebunden zu werden (Abb. 4 und 5).

Da andererseits aber die in vivo mit Salvarsan behandelten Spirochäten eine relativ starke Reduktionskraft erkennen lassen und sich bräunen bzw. schwärzen bei der Nachbehandlung, so kommt die p-Oxy-m-aminophenylarsinsäure als diejenige Substanz, die in den Spirochäten in vivo gebunden wird, nicht in Frage. Daß das Salvarsan als solches hierfür nicht in Frage kommt, haben wir schon bewiesen, da es als intaktes Molekül, d. h. als das Dichlorhydrat der Salvarsanbase mit den lebenden Spirochäten- und Hefezellen nicht in Reaktion tritt. Per exclusionem bleiben daher nur zwei Substanzen übrig, die nach der Umwandlung des Salvarsans im Körper an die Spirochäten gebunden sein können, das p-Oxy-m-aminophenylarsinoxyd und die Salvarsanbase. Wir haben weiterhin auszuschließen, daß das p-Oxy-m-aminophenylarsinoxyd in vivo bereits zu einer Zeit entsteht, ehe die Spirochäten mit dem Salvarsanumwandlungsprodukt in Reaktion getreten sind, wie das bisher allgemein angenommen wurde.

Versuch 9. Wir behandeln in vitro vorerst lebende Hefezellen mit einer 1proz. Lösung von p-Oxy-m-aminophenylarsinoxyd, waschen sie nach Ablauf 1 Stunde in der Zentrifuge ordentlich bis zum Verschwinden der Reaktion (Prüfung der reduzierenden Wirkung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung) und geben ammoniakalisches Silbernitrat alsdann zu den Zellen hinzu.

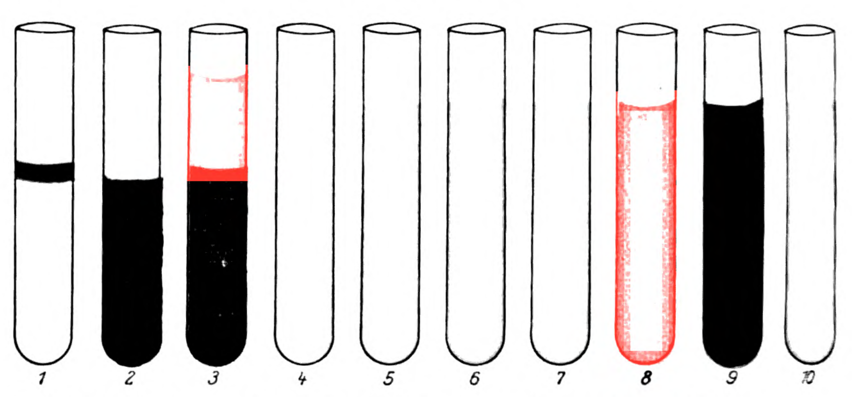


Abb. 1. 20 ccm einer gesättigten, wässerigen Lösung von p-Oxy-m-aminophenylarsinsäure wurden mit der gleichen Menge $\frac{1}{2}$ proz. Lecithinätherlösung $\frac{1}{4}$ Stunde lang im Schüttelapparat geschüttelt. Darauf wurde in einem Zentrifugenröhrchen zu etwa 8 ccm der so erhaltenen Flüssigkeit 2 ccm ammoniakalische Silbernitratlösung gegeben und die Flüssigkeiten durch Zentrifugieren getrennt. Der Äther ist farblos (hellgelb, was der Eigenfarbe des Lecithinäthers entspricht) geblieben, als Zeichen, daß keine reduzierende Substanz in ihn übergegangen ist. Zwischen der wässerigen Flüssigkeit und dem Äther hat sich eine Emissionsschicht eingeschoben. (Zeichnung der Abb. 1 bis 3 kurze Zeit nach dem Zentrifugieren.)

Abb. 2. Gewonnen nach der Versuchsanordnung der Abb. 1, nur unter Verwendung einer 1 proz. wässerigen Lösung des *Natriumsalzes* der erwähnten Arsinsäure, bei schwach alkalischer Reaktion. Äther farblos, wässerige Flüssigkeit infolge Reduktion grauschwarz verfärbt.

Abb. 3. Ebenfalls gewonnen nach der Versuchsanordnung der Abb. 1, aber unter Verwendung gleicher Mengen 1 proz. wässeriger Lösung von p-Oxy-m-aminophenylarsin*oxyd* und $\frac{1}{2}$ proz. Lecithinäther. Der Äther ist hier bräunlich geworden, als Zeichen, daß reduzierende Substanz, die hier nur auf das erwähnte Arsinoxyd bezogen werden kann, in den Äther übergegangen ist.

Abb. 4. Käufliche frische Bäckerhefe wurde im Verhältnis 1 : 10 mit einer wässerigen gesättigten Lösung von p-Oxy-m-aminophenylarsinsäure zu einer gleichmäßigen Suspension in der Reibschale verarbeitet und einige Zeit stehengelassen. Darauf wurden in der Zentrifuge die Hefezellen 15 mal mit Aqua dest. gewaschen. Alsdann wurde die Hefe mit etwa 4 ccm destillierten Wassers aufgeschüttelt und die gleiche Menge 1 proz. ammoniakalischer Silbernitratlösung zugegeben. Die Hefe bleibt farblos, als Zeichen, daß sie keine p-Oxy-m-aminophenylarsinsäure gebunden hat, anderenfalls sie nach einiger Zeit durch Reduktion sich hätte braun färben müssen. (Zeichnung 4 bis 10 angefertigt *vor* der Sedimentierung der Hefe.)

Abb. 5. Gewonnen nach der Versuchsanordnung der Abb. 4, nur unter Verwendung des Natriumsalzes der p-Oxy-m-aminophenylarsinsäure bei schwach alkalischer Reaktion.

Abb. 6. Ebenfalls gewonnen nach Versuchsanordnung von Abb. 4, aber unter Verwendnng einer 1 proz. Lösung von p-Oxy-m-aminophenylarsin*oxyd*. Die Hefe ist hellbraun geworden, als Zeichen, daß sie etwas p-Oxy-m-aminophenylarsinoxyd gebunden enthalten muß, dessen Gegenwart sich durch die eintretende Verfärbung, die auf einer Reduktion des Silbernitrats beruht, verrät. (Der der Abb. 4 bis 6 zugrunde liegende Versuch fällt ebenso aus, wenn man die Lösungen der freien Säure, ihres Natriumsalzes und des Arsinoxyds auch zu einer 10 proz. wässerigen Hefesuspension zugibt.)

Abb. 7. Derselbe Versuch, der der Abb. 6 zugrunde liegt, nur unter Verwendung des erwähnten Oxyds in einer Verdünnung 1 : 10000.

Abb. 8. Zu 50 ccm alkalisierter Altsalvarsanlösung (auf 0,3 g Altsalvarsan kamen 0,57 ccm 15 proz. offizinelle Natronlauge) 1 : 500 wurde die gleiche Menge 10 proz. wässseriger Hefesuspension gegeben und eine Stunde stehengelassen. Die Hefe wurde alsdann 15 mal in der Zentrifuge gewaschen, mit einigen Kubikzentimetern destillierten Wassers aufgeschüttelt und mit der gleichen Menge ammoniakalischer Silbernitratlösung versetzt. Die Hefesuspension ist braun geworden, als Zeichen, daß etwas Altsalvarsan gebunden worden sein muß. Mikroskopisch erkennt man aber nur die toten Hefezellen tiefbraun, die lebenden absolut farblos, einige Exemplare schwach hellbraun gefärbt.

Abb. 9. Aus einer alkalisierten Altsalvarsanlösung eben durch die berechnete Menge 15 proz. Natronlauge ausgefällte Salvarsanbase wurde in der Zentrifuge mehrmals gründlich gewaschen, abzentrifugiert und mit einer 10 proz. wässerigen Hefesuspension aufgeschüttelt und drei Stunden stehengelassen. Während dieser Zeit wurde mehrmals aufgeschüttelt. Darauf 15 maliges Waschen mit destilliertem Wasser und Versetzen mit der gleichen Menge 1 proz. ammoniakalischer Silbernitratlösung. Die Hefe ist tief schwarzbraun geworden, als Zeichen, daß sie große Mengen der Base gelöst und gebunden hat. Mikroskopisch sind alle Hefezellen braun gefärbt, im Gegensatz zu den mikroskopischen Befunden bei Abb. 8.

Abb. 10. Dieselbe Versuchsanordnung wie bei Abb. 8, nur unter Verwendung gleicher Teile einer 2 proz. Lösung von Neosalvarsan in destill. Wasser und 10 proz. Hefesuspension.

Es tritt nur eine geringe Bräunung der Zellen ein (Abb. 6). Dies ist damit zu erklären, daß diese Substanz noch eine geringe Lipoproteidlöslichkeit besitzt, da sie keine sauren Gruppen enthält. Die Bräunung der Zelle ist aber im Verhältnis zu dem gleichen Versuch mit der Salvarsanbase als außerordentlich schwach zu bezeichnen. Auch das Kernbild der Leucocyten, unter Verwendung von p-Oxy-m-aminophenylarsinoxyd und nachfolgender Behandlung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung erhalten, zeigt äußerst hellbraun gefärbte Kerne, im Gegensatz zu der gleichen Behandlung mit einer Salvarsanlösung[1]).

Kehren wir also zur *lebenden* Zelle zurück, so finden wir nur eine relativ geringe Speicherung des p-Oxy-m-aminophenylarsinoxyds in ihr. Stellen wir aber gar höhere Verdünnungen her, beispielsweise 1 : 10000, und behandeln damit lebende Hefezellen, die sich ja bekanntlich ebenso wie Spirochäten verhalten (infolge ihres Lipoproteidgehalts), so bekommen wir nach gründlichem Waschen und Nachbehandeln mit ammoniakalischer Silbernitratlösung überhaupt keine Bräunung mehr (Abb. 7). Nun wird aber in vivo das Salvarsan in viel höherem Grade als im Verhältnis von 1 : 10000 verdünnt. Da aber die Spirochäten eines Primäraffekts eines mit Salvarsan behandelten Menschen ein Salvarsanumwandlungsprodukt enthalten, das noch relativ stark reduziert, so kann als Ursache hierfür per exclusionem nur die von den Spirochäten gebundene Salvarsan*base*[2]) in Frage

[1]) Technik der Herstellung des Neosalvarsan-Albarginkernbildes: Ein Leucocytenausstrich von gonorrhoischem Eiter wird nach Hitzefixation in eine mit Leitungswasser hergestellte Neosalvarsanlösung 1 : 1000 gestellt, in der er 3 bis 5 Minuten verbleibt. Nach Abspülen mit Wasser bringt man einige Tropfen einer 1proz. Albarginlösung darauf. Alsdann entwickelt man unter Hin- und Herschaukeln des Objektträgers während 2 Minuten langer Einwirkung das Bild durch die Albarginlösung. Nach Abspülen mit Wasser wird in der Flamme getrocknet, wodurch das Bild noch etwas an Farbkraft zunimmt. Mikroskopisch sind vorwiegend die Kerne gefärbt, aber auch das Lipoproteid des Leucocytenprotoplasmas hat Anteil an der Färbung. (Die verwendete Albarginlösung wurde so hergestellt, daß 1 g Albargin in 100 ccm destillierten Wassers gelöst wurde, 3 Tropfen konzentrierter, 25proz. NH_3 zugegeben und filtriert wurde.)

[2]) Wie kritiklos des öfteren in vitro erhaltene Versuchsergebnisse auch auf die Prozesse in vivo übertragen werden, geht aus einer Arbeit von *Hauck*, „Probleme der Syphilistherapie", Münch. med. Wochenschr. 1924, Nr. 32 hervor. „Nach solchen Beobachtungen glaubte man sich anfangs zu der Schlußfolgerung berechtigt, daß das Salvarsan die Spirochäten direkt schädige oder vernichte. Versuche in vitro haben aber ergeben, daß auch dem Salvarsan eine die Spirochäten direkt schädigende Wirkung abgesprochen werden muß. Die sichersten Beweise dafür erbringen die Versuche von *Krantz*, welcher feststellen konnte, daß die Spirochaeta pallida sich in salvarsanhaltigen Nährböden, denen Salvarsan in doppelter

kommen, die ihre beiden reduxophoren Gruppen (—OH- plus $-NH_2$-Gruppen) noch besitzt und daher in *so* intensivem Grade zu reduzieren vermag, im Gegensatz zu dem nur *eine* reduxophore Gruppe tragenden p-Oxy-m-aminophenylarsinoxyd[1]).

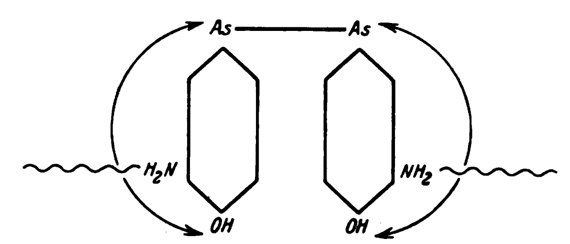
Aus diesen Untersuchungen können wir den Schluß ziehen, daß durch die Vorgänge im strömenden Blute (Sauerstoff, Kohlensäure, Salz- und Lipoidgehalt) durch Rückverwandlung des injizierten Phenolats eine langsame Ausflockung der praktisch wasserunlöslichen Salvarsanbase erfolgt, die alsdann *elektiv* von den lipoproteidhaltigen Syphiliserregern gebunden, quasi abgefangen wird, wofür wir in weiteren Arbeiten die experimentellen Unterlagen beizubringen vermögen. Der Anwesenheit der Alkali- und Erdalkalisalze im Blute kommt hierbei wohl ebenfalls eine Rolle zu. Wir wollen uns hier unserer oben erwähnten, vor einigen Jahren bereits gemachten Beobachtungen erinnern, daß die lebenden Zellen kein Salsarvan zu binden vermögen, hierzu aber imstande waren, als wir den Salvarsanlösungen Salze der Alkali- und Erdalkalimetalle hinzusetzten. In weiteren Versuchen ließ sich zeigen, daß durch Zusatz von Natriumsulfat beispielsweise, vor allem aber durch Ammoniumchlorid und Ammoniumsulfat, ebenso durch Calciumchlorid die Salvarsanbase sich aus dem Dichlorhydrat ausfällen läßt. Hiermit haben wir jetzt auch den Schlüssel für die damals einer Erklärung nicht zugänglichen Beobachtungen. Der Zusatz von Alkali- und Erdalkalimetallsalzen zu den Salvarsanlösungen bewirkt eine Ausfällung der Salvarsanbase, aus welchem Grunde jetzt auch

---

Menge, als es sonst im Körper kreist, zugesetzt war, sehr gut züchten läßt und dadurch ihr Wachstum in keiner Weise beeinträchtigt wird. Trotz seiner ausgesprochen spirochätotropen Wirkung muß deshalb doch auch beim Salvarsan die Schädigung in indirekter Weise, wohl auf dem Wege über die Gewebszellen angenommen werden.“ Das Gegenteil war seinerzeit aber bereits bewiesen (Vortr. a. d. Münch. Derm. Kongr. 1923. „Worauf beruht die spezifisch spirillocide Wirkung des Salvarsans?“), womit nicht in Abrede gestellt werden soll, daß das Salvarsan möglicherweise auch auf indirektem Wege eine gewisse Wirkung auf die Spirochäten zu entfalten vermag, die aber noch zu beweisen wäre. Nach *Hauck* liegen auch für die Annahme einer indirekten Wirkung des Hg bei der Syphilis noch keine sicheren Beweise vor. Dem Verfasser sind offenbar einige Arbeiten entgangen, die die Beweise bereits enthalten dürften. (Worauf beruht die spezifische Wirkung des Hg bei der Luestherapie? Vortr. v. d. Berl. Dermat. Ges. 20. Juni 1922. Dermat. Zeitschr. **38**, 119. Ferner Arch. f. Derm. u. Syph. **145**, 377; diese Zeitschr. **134**, 402ff.

[1]) Aus denselben Gründen ist auch eine Behandlung der Lues mit Abkömmlingen der Phenylarsinsäuren auch niemals mit einer Salvarsanbehandlung zu vergleichen. Siehe auch *Schumacher*, „Zur Stovarsolfrage“, Dermat. Wochenschr. **79**, 1117ff., und *Schumacher*, „Zur Prophylaxe und Therapie der Syphilis mit Stovarsol und Spirocid“, Deutsch. med. Wochenschrift 1925.

hier die lebenden Zellen Salvarsan zu binden vermögen. Dadurch können wir jetzt auch einer Salvarsanlösung in vitro abtötende Eigenschaften verleihen. Die weitere Einwirkung der Salvarsanbase auf die Spirochäten, die alsdann zu deren Abtötung führt, kann daher nur darauf beruhen, daß die im Blute entstehende Salvarsanbase, die dort in kolloidalem Zustande zugegen ist[1]), *elektiv von den Parasiten unter Salzbildung gebunden wird, indem zwei Moleküle Lipoidsäure mit einem Molekül Salvarsan in Reaktion treten, wobei spirochätenlipoidsaures Dioxy-diaminoarsenobenzol* entsteht. Ich darf diese Verhältnisse vielleicht einmal halbschematisch darstellen:



Die Pfeile bedeuten oben: Sauerstoffentziehung durch das As unter dessen Oxydation und Sprengung des Chromophors As=As, unten: Sauerstoffentziehung der Spirochäten durch die reduxophoren Gruppen. Die Wellenlinie auf beiden Seiten soll je ein Molekül Spirochätenlipoidsäure darstellen, die mit der Salvarsanbase ebenso ein additionelles Salz bildet wie auch Nucleinsäure und Salzsäure mit dieser *in vitro*.

Die sauerstoffentziehende Wirkung der Arsenogruppen konnten wir ebenfalls früher schon beweisen.

Versuch 10. Man löst 0,2 g Salvarsan in 200 ccm Wasser und gibt einige Tropfen 15proz. Natronlauge hinzu, bis die sich ausgeschiedene Base gerade wieder gelöst hat. Hiervon werden 5 ccm nach ordentlichem Abkühlen unter der Wasserleitung mit 10 Tropfen Salzsäure[2]) 1 : 4 und 2 ccm 5proz. Natriumnitritlösung versetzt. (Diese Lösung kuppelt mit alkalischem Resorcin zu einem roten Farbstoff und bleibt mit Jodkaliumstärkekleister blau, als Zeichen, daß die Diazotierung vollendet ist.) Alsdann gibt man 12 Tropfen konzentrierten Ammoniaks hinzu[3]) und etwa 7 ccm 1proz. ammoniakalischer Silbernitratlösung. Es tritt keine tief schokoladenbraune Farbe mehr auf, als Zeichen, daß die so behandelte Salvarsanlösung nicht mehr zu reduzieren vermag. Die Flüssigkeit wird strohgelb, nach 24 Stunden ist sie ebenfalls braun gefärbt, aber nicht tief schokoladenbraun, undurchsichtig wie normales Salvarsan bei dieser Behandlung. Die *nach* dieser Zeit auftretende Reduktion rührt von der eintretenden Oxydation des Arsens her.

---

[1]) Bei Gegenwart von Eiweiß fällt CO_2 aus dem Phenolat die Base kolloidal, wie sich experimentell zeigen läßt.

[2]) 37proz., spezifisches Gewicht 1,19 von *Kahlbaum*.

[3]) Bei etwa eintretendem Niederschlag von AgCl muß noch etwas Ammoniak zugegeben werden.

Den *Ehrlichschen Arsenozeptor* erkennen wir daher als aus dem *Lipoproteid* der Spirochäten bestehend. Nach der kurz zuvor erwähnten *primären Verankerung der Salvarsanbase an die Parasiten* setzen sofort die *Reduktionsprozesse* ein und entziehen der sauerstoffarmen[1]) Spirochäte den *Sauerstoff*, wodurch diese erstickt wird und ihren chemischen Feinden erliegt. Diese Wirkung geht in erster Linie *vom Arsen aus*, indem dieses zwei Moleküle Sauerstoff der Spirochäte entziehen muß, um sich zu oxydieren, wobei es unter Sprengung des Chromophors As=As in zwei Moleküle p-Oxy-m-aminophenylarsinoxyd *sekundär* zerfällt. Zur *gleichen Zeit* aber entziehen auch die *reduxophoren Gruppen* des Salvarsans Sauerstoff, und eben diese *doppelte* Reduktionswirkung, die der Salvarsanbase und dem p-Oxy-m-aminophenylarsinoxyd zukommt, gibt diesen beiden Präparaten den *optimalsten Index* unter den therapeutisch gebrauchten Arsenpräparaten, womit biochemisch der Nachweis geführt ist, daß die Abtötung der Spirochäte auf einer *Sauerstoffentziehung* beruhen muß. Andererseits lehren die therapeutischen Resultate mit den nicht reduxophore Gruppen tragenden Verbindungen, beispielsweise dem Arsenophenylglycin, daß die *sauerstoffraubende Wirkung der Arsengruppe zur Abtötung der Spirochäten bereits ausreicht.*

Die sauerstoffarmen Spirochäten erliegen daher der sauerstoffraubenden Wirkung *bereits zu einer Zeit*, zu welcher die sehr sauerstoffreichen Körperzellen, da sie außerdem kraft ihres chemischen Aufbaues viel weniger von der Salvarsanbase zu binden vermögen, noch lange nicht im gleichen Maße geschädigt sind, wodurch die große Spanne zwischen toxischer und heilender Dosis beim Salvarsan entsteht.

Die Erkenntnis, daß einerseits offenbar nur ein kleiner Teil des eingeführten Salvarsans praktisch zur Wirkung kommt und andererseits die Verwendung absolut wasserlöslicher Körper zu chemotherapeutischen Zwecken gar nicht nötig ist, da gerade stärker lipoproteid- als wasserlöslichen, praktisch also wasser*un*löslichen Körpern die abtötende Wirkung zukommt und die Beziehungen zwischen chemischer bzw. physikalischer Konstitution und pharmakologischer Wirkung etwas mehr geklärt erscheinen wie bisher, dürfte für die weitere Entwicklung der Chemotherapie nicht ganz belanglos sein.

Zusammenfassung.

Das Salvarsan wirkt in vitro nicht auf die Spirochäten, da es zu wenig lipoproteidlöslich ist, zur elektiven Speicherung einer Substanz

---

[1]) Die Sauerstoffarmut haben wir durch den Nachweis der Nucleinsäurefreiheit der Spirochaeta pallida bereits früher geführt. Dermat. Wochenschr. **79**, Nr. 46, 1924.

durch die Lipoproteide der Mikroorganismenzellen aber, wie aus unseren erwähnten Untersuchungen hervorgeht, ein Körper erforderlich ist, der *stärker* lipoproteid- als wasserlöslich ist. Erst durch die im Körper stattfindenden Einwirkungen entsteht aus dem Salvarsan eine solche Substanz, die diesen Anforderungen entspricht: die *Salvarsanbase*, die aus diesen Gründen alsdann von den Spirochäten elektiv gespeichert wird und die Spirochäten sowohl durch die sauerstoffentziehende Wirkung des dreiwertigen Arsens, als auch durch diejenige der reduxophoren Gruppen so hochgradig geschädigt werden, daß ihnen ein Weiterleben nicht möglich ist. *Chemisch* gesprochen, wird die Spirochaeta pallida hierdurch *reduziert*, *biologisch* gesprochen, *erstickt*, was ich bereits im Mai 1923 auf dem Münchener Kongreß an Hand der dort demonstrierten Befunde betonte[1]).

Anmerkung während der Korrektur.

1. Nachzutragen wäre, daß die Zersetzung des Dinatriumphenolats des Salvarsans *in vitro* durch die CO_2 den Chemikern bekannt ist, was erst nach Abschluß meiner Untersuchungen durch eine Arbeit von *Bauer* im Handbuch der Salvarsantherapie von *Kolle-Zieler* zu meiner Kenntnis gelangte. Nicht bekannt war aber die Umwandlung des Salvarsans *in vivo*. Den indirekt in dieser Arbeit geführten Nachweis der Entstehung der Salvarsanbase in vivo können wir jetzt auch direkt führen. Injizieren wir einem Kaninchen eine alkalisierte Altsalvarsanlösung (0,3 g in 10 ccm Aqua destillata gelöst) intravenös, so stirbt das Tier fast augenblicklich. Die Sektion ergibt als Todesursache eine *Salvarsanbasenembolie* fast aller Gefäße. Bei so hohen Salvarsandosen im Vergleich zum Körpergewicht des Tieres reichen die Kolloide des Blutserums offenbar nicht mehr aus, um die ausfallende Salvarsanbase kolloidal in Lösung zu halten. Auch beim Rinde erfolgt die Umwandlung des Salvarsans in vivo momentan zur Salvarsanbase infolge des hohen Calciumgehaltes des Rinderserums, nicht dagegen beim Menschen, wozu hier einige Zeit erforderlich ist. Wir kommen hierauf noch zurück.

2. Dort werden wir auch den Beweis dafür zu führen in der Lage sein, daß $CaCl_2$ zur Ausfällung der *freien* Salvarsanbase unter sofortiger hydrolytischer Zersetzung des intermediär entstehenden Calciumphenolats führt und es nicht zur Entstehung von Calciumsalvarsan-

---

[1]) Erscheint ausführlich „Worauf beruht die spezifisch spirillocide Wirkung des Salvarsans?“ Arch. f. Derm. u. Syph. 1925 und Fortsetzung siehe Vortr. v. d. Berl. Mikrobiol. Ges. 15. Dezember 1924. „Ergebnisse der Syphilisforschung“, Sitzungsber. im Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Ref. 1923, und ausführliche Publikation unter diesem Titel in der Derm. Wochenschr. 1925.

verbindungen kommt. Bezüglich der Sulfate ist diese Frage noch nicht endgültig entschieden.

3. Die Sauerstoffentziehung der an die Mikroorganismen gebundenen Salvarsanbase vermögen wir dort ebenfalls dadurch zu beweisen, daß ammoniakalische $AgNO_3$-Lösung, so behandelten Mikroorganismen zugesetzt, gerade da sich innerhalb 24 Stunden bräunt, wo die Mikroorganismen sich befinden.

4. Über die chemische Zusammensetzung der Lipoidsäuren ist nachzulesen „Zur Chemie der Zellkerne usw.“, Chemie der Zelle und Gewebe, Zeitschr. für die Probleme der Gärung 1925.

5. Während es ziemlich gleichgültig ist, wie wir sahen, ob man zum Lösen des Neosalvarsans destilliertes Wasser oder physiologische Kochsalzlösung nimmt, ergab sich bei unseren weiteren Untersuchungen, daß diese Verhältnisse bei dem Altsalvarsan nicht zutreffen, da hierdurch bereits ein Teil der Salvarsanbase in Freiheit gesetzt wird, wobei es jedoch noch nicht zu ihrer Ausfällung kommt, diese aber von den Zellen gebunden wird, weshalb sich bei dieser Versuchsanordnung die Zellen tief schwarzbraun färben. Bei Verwendung von *Hefereinkulturen* fanden wir wider Erwarten, daß die Zellen nach der Altsalvarsanbehandlung mit ammoniakalischer Silbernitratlösung nicht braun, sondern tief schwarzbraun wurden, also offenbar Salvarsanbase gebunden hatten. Das mußte seinen Grund haben. Als Ursache ermittelten wir, wie wir gleich vermuteten, die Gegenwart von Calciumsalzen, die die Salvarsanbase zur Ausfällung bringen. Das Calcium stammte aus dem Bierwürzenährboden. Wird also keine Preßhefe zu den Untersuchungen verwendet, sondern Hefereinkulturen, so müssen deren Zellen erst durch 18maliges Waschen in der Zentrifuge von dem begleitenden Calciumsalz befreit werden, ehe sie mit den Salvarsanlösungen zusammengebracht werden. Sobald Spuren von freier Salvarsanbase in den Altsalvarsanlösungen auftreten, sei es durch den Kohlensäuregehalt der Luft oder durch geringe Mengen von Calciumsalz, wird die Salvarsanbase sofort von den lebenden Zellen gebunden, wodurch auch gleichzeitig sofort eine biologische Einwirkung dieser Altsalvarsanlösungen auftreten *muß*, die den Tod der Zellen zur Folge hat, wie empirisch gewonnene Versuchsergebnisse bereits gezeigt haben. Als weitere Stütze für ihre Annahme (*Voegtlin* und *Smith*) führen sie die von ihnen gemachte Beobachtung an, daß wässerige Lösungen des Salvarsandinatriumsalzes oder des Neosalvarsans beim Stehen an der Luft oder beim Schütteln[1]) (s. auch *Schamberg*, *Kolmer* und *Raziss*, *Simic*) nicht nur eine Zunahme ihrer Giftigkeit, sondern auch gleich-

[1]) Weil hierdurch, durch die Einwirkung der Kohlensäure der Luft, die Salvarsanbase anfängt auszufallen.

zeitig ihrer trypanociden Eigenschaften unter Wegfall[1]) der nach intravenöser Injektion frisch bereiteter Salvarsan- und Neosalvarsanlösungen sonst zu beobachtenden Latenzperiode erfahren. Vor allem konnten *Voegtlin* und *Smith* aber zeigen, daß derartige beim Stehen an der Luft veränderte Lösungen des Dioxydiamidoarsenobenzols ebenso wie die Lösungen des Paraoxymetaaminophenylarsinoxyds in vitro eine momentane abtötende Wirkung auf Trypanosomen entfalten[2]), ganz wie es die theoretische Forderung verlangt.

---

[1]) Die Latenzperiode im Organismus bis zum Eintritt der Salvarsanwirkung ist erforderlich, weil erst aus dem intravenös injizierten Dinatriumphenolat des Salvarsans im Körper die wirksame Salvarsanbase in Freiheit gesetzt werden muß, woran in erster Linie außer der Kohlensäure des Blutes in zweiter Linie auch die Alkali- und Erdalkalimetallsalze beteiligt sind und die Abfangung der entstehenden Salvarsanbase durch die Parasiten in eiweißhaltigen Medien nicht so rasch erfolgt wie in vitro, wie das inzwischen vorgenommene Experimente beweisen, auf die noch zurückgekommen wird.

[2]) Zitiert nach *Schlossberger*, Handbuch der Salvarsantherapie von *Kolle-Ziegler* 1, 218/219. Verlag von Urban & Schwarzenberg, Berlin—Wien.

Über die Wirkungsweise der dreiwertigen und fünfwertigen Arsenpräparate.

Von

Josef Schumacher (Berlin).

(Eingegangen am 26. Februar 1925.)

Nach den Untersuchungen von *Paul Ehrlich* kommt bekanntlich nur den Arsenikalien mit dreiwertigem Arsen eine gute therapeutische Wirkung auf die Syphilis zu, während die fünfwertigen Arsenpräparate von ihm in vitro überhaupt nicht, in vivo nur schwach therapeutisch wirksam befunden wurden. Die in vivo auftretende schwache therapeutische Wirkung der Arsenikalien mit fünfwertigem Arsen erklärt *Ehrlich* damit, daß diese durch die chemischen Prozesse im Körper teilweise zu Präparaten mit dreiwertigem Arsen umgewandelt würden. Dieses verschiedene Verhalten der drei- und fünfwertigen Arsenpräparate sucht *Ehrlich* bekanntlich damit zu erklären, daß er in der Spirochätenzelle einen Arsenoceptor annimmt, der nur auf dreiwertiges Arsen eingestellt sei und nicht auf fünfwertiges. Die chemische Natur des *Ehrlich*schen Arsenoceptors haben wir inzwischen, wie wir uns erinnern wollen, als aus einem *Lipoproteid* bestehend erkannt. In neuerer Zeit wird besonders von *Kritschewsky* und *Brussin*[1]) darauf hingewiesen, daß sicherlich auch physikalisch-chemische Prozesse bei der unterschiedlichen Speicherung der drei- und fünfwertigen Arsenpräparate in Frage kommen dürften.

Aus unserer vorhergehenden Arbeit ist ersichtlich, daß wir die Frage heute dahin beantworten können: Arsenikalien mit dreiwertigem Arsen sind therapeutisch deshalb so außerordentlich wirksam, da sie meistens Substanzen sind, denen *saure* Gruppen fehlen und aus denen durch die Umwandlungsprozesse im Körper die zugehörige *Base* frei gemacht wird, die als stärker lipoproteid- als wasserlösliche Substanz von den Spirochätenlipoproteiden elektiv gespeichert wird, wodurch es nach den vor kurzem geschilderten Prozessen zum Spirochäten-

[1]) Ref. Centralbl. f. Hyg. u. Geschlechtskrankh. **13**, 192. Orig. in d. Zeitschr. f. Immunitätsf. u. exper. Terap. Nr. 1, Orig. **39**, 197 bis 215.

zelltod kommt. Die Arsenikalien mit fünfwertigem Arsen sind meist *minder gut* wirkende Therapeutika, da es fast durchweg Substanzen mit *sauren* Gruppen sind, die dadurch nur eine schwache, oder meistens gar keine Lipoidlöslichkeit mehr besitzen und daher von den Spirochätenlipoproteiden nicht mehr elektiv gebunden werden können.

Versuch 1. Man stellt sich im Schüttelapparat eine gesättigte wässerige Lösung von p-Oxy-m-aminophenylarsinsäure her und gibt zu 20 ccm dieser Lösung die gleiche Menge ½proz. Lecithinätherlösung hinzu. Darauf schüttelt man ¼ Stunde, gibt einige Kubikzentimeter ammoniakalischer Silbernitratlösung hinzu und trennt den Äther durch Abzentrifugieren von der wässerigen Flüssigkeit. Es tritt keine Braunfärbung des Äthers auf, als Zeichen, daß die reduzierend wirkende Säure nicht mit den Lipoiden in chemische Reaktion zu treten vermag (Abb. 1).

Ebenso fällt der Versuch 1a aus, wenn man an Stelle der freien Säure deren Natriumsalz nimmt, indem man dieser einige Tropfen 15proz. Natronlauge zusetzt und zweckmäßig in schwach alkalisierter Lösung arbeitet. Auch hierbei bleibt der Äther farblos (Abb. 2). Erst nach sehr langer Zeit färbt er sich etwas gelblich, während die darunter sich befindende wässerige Flüssigkeit sich jetzt rasch infolge der eintretenden Reduktion in alkalisierter Lösung tief braun färbt, meist unter Abscheidung eines Silberspiegels an den Wänden des Reagenzglases. Auch in der wässerigen Lösung der freien Säure von Versuch 1 tritt nach einiger Zeit eine Reduktionswirkung ein, die sich in einer grauen Verfärbung der wässerigen Lösung dokumentiert. Auch mit den Lipoproteiden der lebenden Zelle kommt es nicht zu einer chemischen Reaktion. Das beweist:

Versuch 2. Man verreibt hierzu 20 ccm einer gesättigten wässerigen Lösung der p-Oxy-m-aminophenylarsinsäure oder ebensoviel Kubikzentimeter einer 1proz. Lösung ihres Natriumsalzes mit 2 g Hefe zu einer gleichmäßigen Suspension, läßt 1 Stunde lang einwirken, zentrifugiert und wäscht die Hefe alsdann gründlich mit destilliertem Wasser in der Zentrifuge. Die restierende Hefe bräunt sich nicht mit ammoniakalischer Silbernitratlösung, als Zeichen, daß sie nichts von dem reduzierend wirkenden Natriumsalz chemisch gebunden hat (Abb. 4 und 5).

Versuch 3. Schüttelt man 20 ccm einer 1proz. Lösung von p-Oxy-m-aminophenylarsinoxyd ¼ Stunde lang mit 20 ccm ½proz. Lecithinätherlösung, gibt alsdann einige Kubikzentimeter ammoniakalischer Silbernitratlösung hinzu und zentrifugiert die wässerige Flüssigkeit ab, so tritt eine Braunfärbung des Äthers auf, die ungefähr ebenso stark ist, wie diejenige der wässerigen Flüssigkeit. Nach einiger Zeit verschieben sich die Farbtöne etwas (Abb. 3).

Das basische p-Oxy-m-aminophenylarsinoxyd besitzt also noch die Fähigkeit, mit Lipoiden in chemische Reaktion zu treten, ebenso im schwachen Grade mit den Lipoproteiden der lebenden Zelle, wie wir dies in der vorigen Arbeit bereits durch Behandeln einer Hefesuspension mit einer wässerigen Lösung von p-Oxy-m-aminophenylarsinoxyd

zeigen konnten. Weiterhin dürften die aus dem Präparat mit fünfwertigem Arsen in vivo durch Reduktion entstehenden wirksamen lipoproteidlöslichen Umwandlungsprodukte während der Zeit ihres Verweilens im Körper nicht quantitativ entstehen, sonst müßte die Intensität der therapeutischen Wirkung bei Präparaten mit fünfwertigem Arsen ebenso groß sein wie diejenige bei den Präparaten mit dreiwertigem Arsen. Aus den oben angeführten Gründen der Gegenwart saurer Gruppen im Molekül und dadurch herabgesetzter Lipoproteidlöslichkeit, verliert auch das Salvarsan, trotz seines dreiwertigen Arsens und trotz seiner reduxophoren Gruppen, seine gute spezifische Wirkung, sofern wir es carboxylieren oder sulfurieren. Die relativ schwache therapeutische Wirkung fünfwertiger Arsenikalien im Vergleich mit derjenigen der dreiwertiges Arsen enthaltenden Präparate erklärt sich daher auf die Weise, daß durch Reduktionsprozesse im Körper die saure $As\begin{smallmatrix}/OH\\ -O\\ \backslash OH\end{smallmatrix}$-Gruppe verschwindet, wodurch die Lipoidlöslichkeit und damit die Wirkung auf die Parasiten eine höhere wird, da alsdann physikalisch wieder die Vorbedingungen dafür geschaffen sind, damit es sekundär chemisch zur Salzbildung kommen kann, der wir die desinfizierende Wirkung sowohl in vivo als auch in vitro zuschreiben müssen, wie wir anderenorts bereits beweisen konnten[1]. Am Beispiel des *Stovarsols* sind wir ja bereits näher auf die Umwandlung fünfwertiges Arsen enthaltender Präparate eingegangen[2].

---

[1]) Vortr. v. d. Berl. Mkrobiol. Ges. 17. November 1924. „Zur chemischen Zusammensetzung der Bakterienkerne und zur Chemie der Desinfektion", Sitzungsber. im Centralbl. f. Bakt., Abt. I, Ref.

[2]) Derm. Wochenschr. 79, 1117ff., 1924 und „Zur Prophylaxe und Therapie der Syphilis mit Stovarsol und Spirocid", Deutsch. med. Wochenschrift 1925.

Über die Synthese des Kohlehydrats im Muskel[1]).

Von

O. Meyerhof, K. Lohmann und R. Meier.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 27. Februar 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Inhaltsübersicht.

Einleitung.

(Von *Otto Meyerhof.*)

Die Synthese von Kohlehydrat spielt eine hervorragende Rolle beim Erholungsvorgang des Muskels, indem hier, wie früher gezeigt worden ist[2]), unter Aufwand von Oxydationsenergie die Milchsäure in Glykogen zurückverwandelt wird, aus dem sie während der Arbeitsphase im Muskel entstand. Da sich die Milchsäure nach Umsatz mit dem Alkaliprotein als Lactat im Muskel befindet, so ruft ihr Ver-

---

[1]) Ein vorläufiger Bericht über den größeren Teil dieser Arbeit erschien in der klin. Wochenschr. 4. Jahrg., **1925**, S. 341.

[2]) Siehe z. B. Ergebn. d. Physiol. **22**, 328, 1923.

schwinden eine Wiederfreisetzung des Alkalis und die Neuionisierung des Proteins hervor. In welcher Weise hiermit der Muskel seine Arbeitsfähigkeit zurückgewinnt, ist wiederholt erörtert worden. Die Frage, die uns jetzt an erster Stelle beschäftigt, ist der Mechanismus dieses Erholungsprozesses, der sich durch die starke Steigerung des Ruhesauerstoffverbrauchs, eine vermehrte Oxydation von Kohlehydrat (der respiratorische Quotient ist genau 1) und damit festgekoppelter Rückverwandlung der Milchsäure in Glykogen charakterisiert. Welches ist das auslösende Moment des Erholungsvorganges? Es erscheint von vornherein entweder möglich, daß die Arbeitsleistung des Muskels eine besondere physikalisch-chemische Veränderung hervorruft, durch die die Erhöhung der Ruheatmung veranlaßt wird, die nun zwangsläufig die Resynthese der Milchsäure herbeiführt, oder — und dies war von vornherein wahrscheinlicher —, daß es die Milchsäure selbst ist, deren Anhäufung diese Folge hat. Denn der gleiche Vorgang spielt sich auch ohne Arbeit bei bloßem längeren Aufenthalt des Muskels in Stickstoff und nachheriger Verbringung in Sauerstoff ab, doch ist auch hier die Milchsäure im Muskelinnern entstanden, und die Frage blieb offen, ob auch von außen zum Muskel zugesetzte Milchsäure einen ähnlichen „Erholungsprozeß" auslösen kann.

Auf Grund dieser Überlegung haben wir zunächst angefangen, Froschschenkel mit Milchsäure zu durchströmen, zumal die amerikanischen Autoren *Barr* und *Himwich*[1]) beim Menschen ein Verschwinden von Milchsäure aus dem Blute beim Durchströmen ausgeruhter Muskelgruppen gefunden hatten, wobei sie allerdings nicht sicher waren, ob das Verschwinden durch bloße Verteilung der Milchsäure auf das Muskelinnere oder einen chemischen Vorgang veranlaßt sei. Über die Durchströmungsversuche an Froschschenkeln, die Dr. *Rolf Meier* noch im Kieler physiologischen Institut ausführte, berichten wir im ersten Kapitel. Sie ergaben bereits trotz gewisser Schwankungen positive Resultate, indem bei zwei- bis dreistündiger Durchströmung bei Zimmertemperatur durchschnittlich eine geringe Zunahme von Kohlehydrat festzustellen ist. Später zeigte sich, daß dieser Vorgang viel einfacher, besser reproduzierbar und mit erheblich größeren Ausschlägen beobachtet werden kann, wenn man dünne Froschmuskeln (Sartorien oder kleine Gastrocnemien) in milchsäurehaltige Ringerlösung einlegt, und daß der Mechanismus dieser Synthese sich dabei gleichzeitig studieren läßt. Diese und daran anschließende Versuche, welche von mir gemeinsam mit Dr. *Lohmann* ausgeführt worden sind, sind in den folgenden Kapiteln beschrieben.

---

[1]) Journ. of biol. Chem. 55, 525, 1923.

I. Durchströmungsversuche von Froschschenkeln.

Die Durchströmung der Froschschenkel geschah in drei verschiedenen Versuchsserien: In der ersten als Kontrollserie wurde ein Bein abgetrennt und das andere mit milchsäurefreier, sauerstoffgesättigter Ringerlösung durchströmt; in der zweiten wurde ebenfalls zuvor ein Bein abgetrennt und das andere mit milchsäurehaltiger Ringerlösung — stets annähernd neutralisierte 0,11 proz. Milchsäure —, die ebenfalls sauerstoffgesättigt war, durchströmt; in der dritten schließlich wurde gleichzeitig unter demselben Druck das eine Bein mit milchsäurefreier, das andere mit milchsäurehaltiger sauerstoffgesättigter Ringerlösung durchströmt. In beiden Schenkeln wurde nach Versuchsende entweder nur das Glykogen oder getrennt Glykogen und niedere Kohlehydrate meist in Doppelanalysen bestimmt nach den früher beschriebenen Methoden[1]). Die Berechnung des Kohlehydratumsatzes geschah, wie üblich, in Prozenten des Froschmuskelgewichts.

Die Durchströmung wurde mit der von *Barkan*, *Broemser* und *Hahn* abgeänderten Ringerlösung vorgenommen, die mit 5 Proz. Kohlensäure enthaltendem Sauerstoff gesättigt war[2]). Der hydrostatische Druck betrug 25 cm Wasser. Zur Durchströmung wurden männliche Frösche nach Ausbohrung des Rückenmarks auf schrägem Brett befestigt, die vordere Bauchwand wurde nach unten geklappt, der Darm wurde vom Rectum ab entfernt und nach Unterbindung der Nierengefäße die Aorta abdominalis mit einem Schlitz eröffnet. Durch diese Öffnung wurden fein ausgezogene Kanülen in die rechte und linke Arteria iliaca vorgeschoben und befestigt. Auch wurden in die beiden Venae femorales Glaskanülen eingebunden, aus denen die Durchströmungsflüssigkeit in Meßzylinder austropfte. Die Durchströmung konnte 2 bis 3 Stunden fortgesetzt werden, ohne daß Verschluß der Gefäße oder ein zu hochgradiges Ödem auftrat (das Muskelgewicht änderte sich dabei kaum). Von Gummiarabicumzusatz nahmen wir Abstand, weil er keinen deutlichen Einfluß zeigte.

In Tabelle I ist eine Kontrollserie von sechs Versuchen mitgeteilt, bei der *ein* Bein vor Versuchsbeginn abgeschnitten wurde, das andere 2 bis 3 Stunden mit reiner Ringerlösung durchströmt ist. Die Differenz beider Seiten ist, von *einem* Versuch abgesehen, innerhalb der Fehlergrenzen. Sie beträgt nur etwa 2 Proz. des jeweiligen Kohlehydratgehalts. Nur in einem Falle ist eine Abnahme von 10 Proz. des Gehalts zu verzeichnen. Aus der Atmungsgröße des Muskels bei 20° berechnet sich bei ausschließlicher Kohlehydratverbrennung in 2 bis 3 Stunden eine Oxydation von 0,01 bis 0,02 Proz. Kohlehydrat. Daß der Durchschnittswert der sechs Versuche gerade eine solche Abnahme von 0,015 Proz. ergibt, muß jedoch als zufällig betrachtet werden.

---

[1]) *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. 185, 11, 1920; 188, 114, 1921.
[2]) *Barkan*, *Broemser* und *Hahn*, Zeitschr. f. Biol. 74, 1, 1922.

Tabelle I.

Ein Bein vor Beginn abgeschnitten, das andere Bein durchströmt mit O_2-gesättigter Ringerlösung.

Nr.	Nicht durchströmtes Bein: Muskelgewicht	Nicht durchströmtes Bein: Niedere Kohlehydrate	Nicht durchströmtes Bein: Glykogen	Summe	Durchströmung: Temperatur	Durchströmung: Zeit	Durchströmung: Menge	Durchströmtes Bein: Muskelgewicht	Durchströmtes Bein: Niedere Kohlehydrate	Durchströmtes Bein: Glykogen	Summe	Differenz
	g	Proz.	Proz.	Proz.	°C		ccm	g	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
1	5,4	—	0,352	—	19	2h	100	5,3	—	0,358	—	+ 0,008
2	5,8	—	0,68	—	19	2	102	5,6	—	0,68	—	± 0
3	5,9	0,234	0,36	0,594	20,5	3	80	7,2	0,152	0,44	0,596	+ 0,002
4	6,85	0,237	0,55	0,787	22,5	3	155	7,7	0,26	0,52	0,78	— 0,007
5	6,85	0,235	0,41	0,645	22,5	2	125	6,25	0,252	0,315	0,567	— 0,078
6	7,7	0,22	0,379	0,599	22,5	2 50′	150	7,6	0,162	0,422	0,584	— 0,015
									Durchschnitt			— 0,015

In Tabelle II ist *ein* Bein vor Versuchsbeginn analysiert, das andere mit 0,11 proz. Milchsäure für 2 bis 3 Stunden durchströmt, wobei etwa 100 ccm durchgeflossen sind. Von acht Versuchen dieser Serie sind sechsmal zum Teil beträchtliche Zunahmen des Glykogens aufgetreten, in vier Fällen über 10 Proz. des jeweiligen Gehalts, während in zwei Fällen eine Abnahme um etwa 5 Proz., noch innerhalb der Fehlergrenzen, vorkam. Im Durchschnitt ergibt sich in acht Versuchen eine Zunahme von etwa 5 Proz. der Gesamtmenge Kohlehydrat oder 0,035 Proz., auf das Muskelgewicht bezogen.

Tabelle II.

Ein Bein gleich vor Beginn des Versuchs abgeschnitten, das andere Bein durchströmt mit O_2-Ringerlösung + 0,11 Proz. Milchsäure.

Nr.	Nicht durchströmtes Bein: Muskelgewicht	Nicht durchströmtes Bein: Niedere Kohlehydrate	Nicht durchströmtes Bein: Glykogen	Summe	Durchströmung: Temperatur	Durchströmung: Zeit	Durchströmung: Menge	Durchströmtes Bein: Muskelgewicht	Durchströmtes Bein: Niedere Kohlehydrate	Durchströmtes Bein: Glykogen	Summe	Differenz
	g	Proz.	Proz.	Proz.	°C		ccm	g	Proz.	Proz.	Proz.	Proz.
1	5,95	—	0,895	—	19	2h	100	6,0	—	0,985	—	+ 0,09
2	6,9	—	0,88	—	19	3	120	6,9	—	0,995	—	+ 0,115
3	7,75	—	0,37	—	19	2 30′	90	7,7	—	0,42	—	+ 0,05
4	6,3	—	0,54	—	19,5	2 30	80	6,2	—	0,56	—	+ 0,02
5	5,9	0,198	0,425	0,623	21	3	80	7,6	0,189	0,408	0,597	— 0,026
6	12,8	0,132	0,701	0,832	22	3	140	13,2	0,128	0,708	0,836	+ 0,004
7	7,7	0,26	0,47	0,73	22	2 40	120	8,7	0,225	0,57	0,795	+ 0,065
8	9,65	0,207	0,622	0,829	19	3	155	12,0	0,146	0,64	0,786	— 0,037
									Durchschnitt			+ 0,035

Schließlich sind in Tabelle III die sechs Versuche verzeichnet, bei denen ein Bein mit Milchsäure, das andere ohne dieselbe durch-

strömt ist. Hier ist in allen Versuchen, mit Ausnahme von einem, eine Zunahme des Kohlehydrats bei der Durchströmung zu verzeichnen. Im Durchschnitt ergibt sich wieder eine Zunahme von 0,035 Proz., was bei dem niedrigen Kohlehydratgehalt dei Schenkel etwa 10 Proz. desselben ausmacht. Berechnet man die Kohlehydratzunahme auf die durchströmte Milchsäuremenge, so erhält man bei einem Durchschnittsgewicht jedes Schenkels von 8 g und einer durchschnittlichen Durchströmung von 90 bis 100 ccm eine Abnahme des Milchsäuregehalts von etwa 3 Proz. in der Durchströmungsflüssigkeit. Wahrscheinlich wäre es günstiger gewesen, mit geringerem Milchsäuregehalt zu durchströmen. Doch kann man nach diesen Versuchen eine geringe Synthese von Kohlehydrat bei der Durchströmung als festgestellt annehmen.

Tabelle III.

Beide Beine durchströmt, eins mit sauerstoffgesättigter Ringerlösung, das andere mit sauerstoffgesättigter Ringerlösung + Milchsäure.

	Ohne Milchsäure durchströmtes Bein							Mit 0,11 proz. Milchs. durchströmtes Bein						
Nr.	Temperatur	Muskelgewicht	Niedere Kohlehydrate	Glykogen	Summe	Zeit	Durchgeflossene Menge	Muskelgewicht	Niedere Kohlehydrate	Glykogen	Summe	Zeit	Durchgeflossene Menge	Differenz
	°C	g	Proz.	Proz.	Proz.		ccm	g	Proz.	Proz.	Proz.		ccm	Proz.
1	19	6,6	—	0,324	—	1h45'	60	6,2	—	0,365	—	1h45'	70	+ 0,041
2	20	6,6	—	0,289	—	3	90	6,4	—	0,387	—	3	100	+ 0,098
3	20	5,7	—	0,315	—	2	70	5,8	—	0,355	—	2	60	+ 0,04
4	21	7,1	0,21	0,22	0,43	1 45	80	6,9	0,22	0,23	0,45	1 45	80	+ 0,02
5	22	7,7	0,182	0,33	0,512	2	90	8,7	0,191	0,29	0,481	2	100	— 0,032
6	22	7,4	0,261	0,43	0,691	3	120	7,2	0,251	0,472	0,723	3	110	+ 0,032
											Durchschnitt			+ 0,033

II. Kohlehydratsynthese aus Milchsäure im ausgeschnittenen Muskel.

Die Frage nach dem auslösenden Faktor des oxydativen Erholungsvorgangs läßt sich auf eine überraschend einfache Weise beantworten. Legt man nämlich vorsichtig präparierte Sartorien des Frosches in lactathaltige Ringerlösung ein, so steigt die Atmungsgröße um gut 100 Proz. gegenüber dem symmetrischen Muskel, und gleichzeitig nimmt der Kohlehydratgehalt zu. Bei Benutzung von Gastrocnemien ist zwar die Atmungssteigerung geringer und setzt auch langsamer ein, was jedenfalls auf das verzögerte Eindringen der Milchsäure in den Muskel zu beziehen ist. Da andererseits die Gastrocnemien eine konstantere Ruheatmung besitzen und die Gewichtsmengen derselben sich für Kohlehydratbestimmungen besser eignen, wurde die überwiegende Zahl unserer Versuche mit diesen angestellt.

Methodik.

Die Versuchstemperatur betrug stets 20°. Die Atmungsmessungen geschahen wie bisher nach der verbesserten Methode von *Warburg-Siebeck*. Falls gleichzeitig mit dem Sauerstoffverbrauch die Kohlehydrate bestimmt werden sollten, benutzten wir große Atmungströge von etwa 50 ccm Inhalt und breitem Boden, in die zwei oder drei mittelgroße Gastrocnemien in etwa 5 ccm Ringerlösung gefüllt wurden. Es wurden dann die dazu symmetrischen Gastrocnemien derselben Frösche in ein zweites Gefäß getan, das mit 5 ccm Ringerlösung + Milchsäure oder einer anderen Versuchslösung gefüllt war. In einigen Fällen wurden auch die symmetrischen Gastrocnemien zu Beginn verarbeitet und der Kohlehydratgehalt vor und nach der Atmung bestimmt.

In einigen Versuchen wurde nur das Glykogen, nach der abgekürzten Methode von *Pflüger*, bestimmt, in der Mehrzahl der Fälle die Gesamtkohlehydrate. Die Verarbeitung der Muskeln geschah stets unter den von *Fletcher* und *Hopkins* ermittelten Kautelen zur Verhinderung von Milchsäurebildung. Während diese bei Verarbeitung von Muskeln auf Milchsäure sich allgemeiner Anwendung erfreuen, werden sie fälschlicherweise vielfach bei der Messung des Kohlehydratgehalts vernachlässigt, obgleich der hierbei entstehende Fehler genau so groß ist. Denn was an Milchsäure entstanden ist, ist an Kohlehydrat verloren. Die Gesamtkohlehydrate ermittelten wir meist nach der bequemen Methode von *E. J. Lesser*[1]) mit geringen Modifikationen. Die in eisgekühlter, 2,2proz. Salzsäure zerriebenen Muskeln wurden direkt 3 Stunden im Wasserbade hydrolysiert, die Lösung neutralisiert, nach Zusatz von Essigsäure mit Quecksilberacetat versetzt, nach längerem Stehen filtriert, mit H_2S entquecksilbert und in einem Teil der Zucker nach *Bertrand* (meist Modifikation von *Moeckel-Frank*) bestimmt. *Lesser* selbst hat mit dieser Methode 10 bis 18 Proz. höhere Werte gefunden als bei der Glykogenbestimmung allein. Das kommt zum Teil zweifellos durch die in letzterem Falle nicht mitbestimmten niederen Kohlehydrate. Indes fanden wir, auch wenn wir diese getrennt gemessen hatten und den von *Nerking* ermittelten Verlust von 3 Proz. bei der Verarbeitung des Glykogens mit berücksichtigten, noch immer eine Differenz von gegen 10 Proz. Es liegt dies vermutlich an der Bildung anderer reduzierender Substanzen bei der Gesamthydrolyse des Muskels. Da wir jedoch hierbei völlig gleichmäßig verfuhren und insbesondere die Parallelversuche stets gleichzeitig im selben Wasserbad hydrolysiert wurden, müssen sich etwaige Fehler bei der Bestimmung der Differenz des Kohlehydratgehalts herausheben.

Tabelle IV.
Vergleich der Methode von *E. J. Lesser* und unserem bisher geübten Verfahren.

Nr.	Muskelgewicht g	Zucker nach *Lesser* mg	Zucker nach *Lesser* Proz.	a) Glykogen b) Niedere Kohlehydrate	a) b) Proz.	Gesamtkohlehydrate Proz.
1	4,97	61,8	1,24	a) 46,3 b) 5,97	a) 0,955 b) 0,12	1,075
2	7,46	105,35	1,415	a) 86,3 b) 12,5	a) 1,14 b) 0,16	1,30

[1]) Diese Zeitschr. **103**. 1, 1920.

Lesser selbst fand mit dieser Methode an symmetrischen Froschschenkeln in elf Versuchen Differenzen von 0,7 bis 9,9 Proz., durchschnittlich von 5 Proz. des Kohlehydratgehalts auf beiden Seiten. In unseren Versuchen, in denen nur einmal ganze Schenkel, sonst je zwei bis drei symmetrische Gastrocnemien verglichen wurden, war das Resultat etwas günstiger. Die Abweichungen betrugen nicht über 5 Proz. In Versuch 1 ist die Übereinstimmung von mehreren Bestimmungen am gleichen Schenkel gezeigt.

Tabelle V.

Vergleich des Kohlehydratgehalts in symmetrischen Muskeln.

Nr.	Datum 1924	Gewicht jeder Seite	mg Zucker Muskel 1	mg Zucker Muskel 2	Proz. Zucker Muskel 1	Proz. Zucker Muskel 2	Differenz in Proz. des Muskelgewichts	Differenz in Proz. des Kohlehydrats
1	30. X.	10,33	94,1	—	0,91	—	—	—
			93,1	—	0,90	—	—	—
			91,5	—	0,885	—	—	—
			94,2	—	0,91	—	—	—
2	1. XII.	1,33	17,6	18,3	1,32	1,375	0,055	4,2
3	3. XII.	1,65	22,6	21,7	1,37	1,32	0,05	3,7
4	4. XII.	1,33	21,2	20,7	1,595	1,555	0,04	2,6
5	8. XII.	4,50	45,25	—	1,05	—	0,04	3,7
		4,35	—	47,4	—	1,09	—	—

Durch weitere Versuche überzeugten wir uns, daß weder die Anwesenheit von Milchsäure noch die in den späteren Kapiteln benutzten Zusätze, insbesondere Brenztraubensäure, Glycerinsäure, Äthylenglykol bei der Bestimmung eine Störung verursachen.

Über die Atmungsgröße symmetrischer Muskeln sind schon früher zahlreiche Kontrollen angestellt. Während in der Anfangszeit bei beiden Muskeln erhebliche Differenzen auftreten können, stimmt die Atmung, wenn sie im Laufe von 2 bis 3 Stunden auf den eigentlichen Ruhewert des ausgeschnittenen Muskels abgefallen ist, meist auf beiden Seiten innerhalb weniger Prozente überein. Immerhin kommen auch gelegentlich größere Abweichungen ohne erkennbare Ursachen vor. Jedoch sind die im folgenden beschriebenen Atmungssteigerungen erheblich über dieser Schwankungsbreite.

Die Größe der Atmungssteigerung bei Einlagerung von Sartorien in Milchsäure ist aus den in der Tabelle VI gegebenen Beispielen zu ersehen, wo stets symmetrische Muskeln mit und ohne Lactat verglichen sind. Die Konzentration der Milchsäure hatte keinen deutlichen Einfluß, ebensowenig wie Änderungen der p_H, die durch Phosphatgemische variiert wurde. Die Größe der Atmungssteigerung ist wohl zur Hauptsache durch die Geschwindigkeit des Eindringens bedingt, und dementsprechend steigt die Atmung bei Gastrocnemien nach Zusatz des milchsauren Natriums erst im Laufe mehrerer Stunden auf den maximalen Wert, der bei Sartorien schon in viel kürzerer Zeit erreicht wird.

Tabelle VI.

Atmungssteigerung durch milchsaures Natrium.

Nr.	Datum 1924	Zahl der Muskeln jeder Seite	Muskeln jeder Seite g	Suspensionslösung	p_H	Mol. Konzentration	Versuchszeit	Kontrollmuskel cmm O_2 pro g u. Std.	Milchsäuremuskel cmm O_2 pro g u. Std.	Atmungssteigerung Proz.
1	17. X.	2	0,45	Ringer-Bicarbonat	—	0,03	3h30′	28	69	150
2	24. X.	2	0,4	Ringer	—	0,035	3	28,5	62	155
3	29. X.	1	0,22	Ringerphosphat	7,15	0,025	4	37,5	66	80
4	31. X.	1	0,20	Ringer-K.-Phosphat	7,35	0,025	4	24	40	70
5	31. X.	1	0,23	Ringer-Na.-Phosphat	7,35	0,025	5	21,5	60	180

Daß bei der *Erholung* des Muskels die starke Steigerung der Atmung auf die Anwesenheit des Lactats, nicht aber auf die gesteigerte Wasserstoffionenkonzentration zurückzuführen ist, ergibt sich eindeutig daraus, daß diese letztere die Atmung nicht steigert, sondern sogar herabsetzt. Beispiele:

1. zwei Sartorien in Ringerphosphatgemisch für 3 Stunden:

   a) p_H 7,65 . . . . 62 cmm O_2
   b) p_H 6,0 . . . . 36 „ O_2

2. Zwei Sartorien in 3 Stunden:

   a) p_H 7,65 . . . . 43 cmm O_2
   b) p_H 5,0 . . . . 31 „ O_2

Die wichtigste Erscheinung beim Zusatz des Lactats ist aber die gleichzeitig mit der Atmungssteigerung einsetzende Synthese des Glykogens, ja darüber hinaus die Tatsache, daß wir eben dasselbe Verhältnis von synthetisiertem Kohlehydrat und Extrasauerstoff erhalten wie bei der Muskelerholung. In einer Reihe von Arbeiten ist dieses Verhältnis bereits untersucht worden, das als Oxydationsquotient der Milchsäure bezeichnet wurde:

$$\frac{\text{insgesamt verschwundene Milchsäure}}{\text{oxydierte Milchsäureäquivalente}}.$$

Die verschwundene Milchsäure wurde bisher direkt bestimmt, während sie bei den hier vorliegenden Versuchen aus dem synthetisierten Kohlehydrat + dem aus dem Extrasauerstoff berechneten verbrannten Anteil ermittelt wurde. Die oxydierten Milchsäureäquivalente sind wie bisher aus dem Extrasauerstoff bestimmt, indem drei Moleküle Sauerstoff ein Molekül Milchsäure bzw. ein

halbes Molekül Zucker oxydieren. In der Tabelle VII sind in den ersten fünf Versuchen die Gesamtkohlehydrate, in den zwei letzten nur das Glykogen bestimmt. Stets wurden in den einen Atmungstrog von etwa 40 bis 50 ccm zwei bis drei Gastrocnemien in reiner Ringerlösung gefüllt (öfters zur Konstanterhaltung der Reaktion unter Zusatz von etwas Phosphat, das aber auf die Synthese keinerlei Einfluß hat), in den zweiten Trog die symmetrischen Muskeln unter Zusatz von 0,025 bis 0,03 n milchsaurem Natrium. Am Schluß wurden die Kohlehydrate beider Seiten verglichen. Auch wenn die eine Hälfte des Muskeln am Anfang, die andere am Schluß verarbeitet wurde, läßt sich eine Vermehrung des Kohlehydrats beim Aufenthalt in der Milchsäure-Ringerlösung feststellen, die jedoch nur unbedeutend ist. Bei den Gastrocnemien ist, wie oben erwähnt, die Atmungssteigerung kleiner als bei den Sartorien, und sie setzt auch langsamer ein. Neben dem Extrasauerstoffverbrauch geht aber natürlich die Ruheatmung dauernd fort. Da nun in dieser Kohlehydrat verbrennt, müssen sich die Effekte der Zuckeroxydation und Zuckersynthese bis zu einem gewissen Grade kompensieren. Auch wenn man, wie es hier geschieht, den Kohlehydratgehalt der Kontrollmuskeln und der in Milchsäure liegenden am Schluß des Versuchs vergleicht, ist zu bedenken, daß der Extrasauerstoff eine weitere Menge Kohlehydrat verbrennen muß, so daß ohne die Synthese der Zuckergehalt dieser Muskeln gegenüber den Kontrollmuskeln hätte vermindert sein müssen. Der Oxydationsquotient ergibt sich im Mittel zu 4,33 in auffällig guter Übereinstimmung mit dem bisher bestimmten. Derselbe wurde in früheren Arbeiten am Muskel festgestellt: 1. bei der Erholung nach der Arbeitsleistung, 2. bei der Erholung nach der Ruheanaerobiose, 3. bei der Ruheatmung selbst, 4. im zerschnittenen Muskel mit und ohne Sauerstoff, 5. am ganzen lebenden Tiere nach der Ermüdung. In allen Fällen ergaben sich Werte zwischen 3 und 5,5. Ebenso berechnet sich ein Quotient von etwa 5 aus den myothermischen Messungen von *Hartree* und *Hill*. Daß unter ganz verschiedenen Umständen dieser Quotient immer annähernd dieselbe Größe besitzt, spricht dafür, daß er eine Grundeigenschaft des Muskelstoffwechsels repräsentiert.

Die tatsächlich in unseren Versuchen beobachteten Schwankungen muß man der Methodik zuschreiben. Da die Kohlehydratsynthese etwa 10 bis 15 Proz. des vorhandenen Kohlehydratgehalts ausmacht, aber die Schwankungen beim Vergleich symmetrischer Muskeln etwa 4 Proz. betragen, so ergibt dies eine Ungenauigkeit von gut 30 Proz. Hierzu treten Differenzen von gleicher Größenordnung beim Vergleich der Ruheatmung beider Seiten. Daneben erscheint es aber nicht ausgeschlossen, daß auch hier ähnlich wie bei der Erholung der Zustand des Muskels die Größe des Quotienten beeinflußt.

In der Tabelle VII ist eine Übersicht über die Versuche gegeben.

Tabelle VII. Kohlehydratsynthese aus zugesetzter Milchsäure.

A. Sauerstoffmessungen.

Nr.	Datum	Muskelgewicht jeder Seite	Atmungszeit	cmm O_2 in den Kontrollmuskeln	cmm O_2 in den Milchsäuremuskeln	Extrasauerstoff mg	cmm O_2 der Kontrollmuskeln pro g und Std.
	1924						
1	21. X.	1,30	21h	943	1385	**0,68**	34,5
2	28. X.	1,30	18 30'	783	1025	**0,345**	32,5
3	31. X.	2,08	18 20	1212	1686	**0,678**	32.5
4	5. XI.	1,49	6 30	514	1200	**0,98**	51
5	6. XI.	1,28	16	515	977	**0,661**	25
6	15. XII.	1,05	15 30	479	628	**0,218**	29,5
	1925						
7	13. I.	1,50	15 30	786	1133	**0,497**	34

B. Kohlehydratbestimmung und Bilanz.

Nr.	mg Kohlehydrat		Proz. Kohlehydrat		Synthese berechnet Proz.	Synthese berechnet mg	Milchsäureäquivalent oxydiert mg	Oxydationsquotient
	in den Kontrollmuskeln	in den Milchsäuremuskeln	in den Kontrollmuskeln	i. d. Milchsäuremuskeln				
1	15,1	17,2	1,16	1,32	0,21	**2,7**	0,59	**4,7**
2	15,2	17,2	1,165	1,32	0,18	**2,85**	0,323	**7,2**
3	19,7	21,3	0,94	1,03	0,12	**2,28**	0,633	**3,5**
4	16,4	17,5	1,10	1,17	0,13	**2,02**	0,92	**2,2**
5	20,3	22,0	1,585	1,72	0,185	**2,82**	0,62	**3,75**
6*)	7,4	8,35	0,71	0,80	0,11	**1,15**	0,20	5,7
7*)	13,1	14,15	0,87	0,94	0,105	**1,52**	0,465	**3,25**
						Durchschnitt		4,33

*) Nur Glykogen bestimmt.

Man sieht aus den Versuchen 6 und 7 der Tabelle VII, in denen allein das Glykogen bestimmt ist, daß dessen Zunahme gleich der des Gesamtkohlehydrats in den anderen Versuchen ist. Ebenso wie in den früheren Arbeiten gezeigt wurde, daß bei der Erholung und Ermüdung die Menge der niederen Kohlehydrate sich nicht wesentlich ändert, sondern nur der Glykogengehalt dem Umsatz der Milchsäure korrespondiert, so ist das auch in den vorliegenden Versuchen der Fall.

Die eingangs erörterte Frage ist damit eindeutig beantwortet. Das bei der Ermüdung gebildete Lactat hat einen spezifischen Einfluß, durch den es die Oxydation im Muskel steigert und dank der Koppelung dieser Oxydation mit der Synthese der Milchsäure sein eigenes Wiederverschwinden herbeiführt. Das ist die Ursache des Erholungsprozesses.

III. Synthese des Kohlehydrats aus Brenztraubensäure.

In der gleichen Anordnung wurden von uns zahlreiche andere Substanzen geprüft, ob sie im ausgeschnittenen Muskel ebenfalls eine Kohlehydratsynthese veranlassen. An erster Stelle untersuchten wir die als Zuckerbildner im tierischen Organismus angesehenen Stoffe.

Ruft der Zusatz einer Substanz überhaupt keine Atmungssteigerung hervor, so ist eine Kohlehydratsynthese ausgeschlossen, denn ohne einen Aufwand von Oxydationsenergie kann diese nach allem, was wir wissen, nicht zustande kommen.

Wenn jedoch umgekehrt ein Stoff die Oxydation steigert, so ist dies natürlich noch kein Beweis, daß er in der angegebenen Weise wirksam ist. Denn jede Art von Reizung des Muskels, jede Alteration seiner Struktur, jede Auslösung noch so geringfügiger Muskelkontrakturen durch chemische Stoffe wirkt, wie früher gezeigt wurde, auf den intakten ruhenden Muskel atmungssteigernd, und zwar auf dem Wege über eine Erhöhung der Milchsäurebildung. Es sei vorweg gesagt, daß in unseren Versuchen nur ein einziger Stoff am ausgeschnittenen Muskel eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauchs dadurch veranlaßt, daß er dabei zu Glykogen synthetisiert wird, nämlich die Brenztraubensäure. Die anderen „Zuckerbildner" lassen entweder die Atmung unbeeinflußt, hemmen sie oder rufen geringe oder unregelmäßige Steigerungen derselben hervor. Es wurde aber auch bei diesen letzteren eine die Fehlergrenzen überschreitende Zunahme des Kohlehydrats vermißt, meist ergab sich eine Abnahme, entsprechend der gesteigerten Atmung. Die Substanzen wurden in n/20 bis n/100 Konzentration geprüft. Im einzelnen ergab sich: Ohne Einfluß auf die Atmungsgröße erwiesen sich Glucose, Fructose, Alanin, Dioxyaceton, Asparagin, Glycerinphosphorsäure, Glykolsäure. Schwach und gelegentlich steigerten die Atmung Äthylenglykol, Glykolaldehyd, eventuell Dioxymaleinsäure nach Abzug der spontanen Oxydation. Glycerinaldehyd (n/20) steigert die Atmung regelmäßig um etwa 30 Proz. Stark, aber nicht regelmäßig, steigert glycerinsaures Natrium, Glycerin. Acetaldehyd hemmt in allen Konzentrationen bis herab zu n/500, Methylglyoxal steigert schwach in n/100 Lösung. Mit diesem erhält man in der Tat eine geringe Zunahme des Kohlehydrats, die jedoch auf die Milchsäure zurückgeführt werden kann, die in Gegenwart von Muskeln aus dem Methylglyoxal rasch entsteht. Alle anderen Stoffe ergeben ein negatives Resultat. [Dioxyaceton, Glycerinaldehyd, Dioxymaleinsäure verdanken wir Herrn *Neuberg*, Glykolaldehyd stellten wir aus der letzteren nach der Vorschrift von *Parnas* und *Baer*[1]) dar; Methylglyoxal wurde uns freundlichst von der Firma Schering, sowie ein anderes Präparat von Herrn Dr. *Hermann O. L. Fischer*, Berlin, geliefert.]

Ganz anders ist das Verhalten der Brenztraubensäure. Diese steigert die Atmung in ähnlichem Umfang wie die Milchsäure um 50 bis 150 Proz. in n/40 bis n/100 Lösung, und dabei nimmt der Kohlehydratgehalt der Muskeln regelmäßig zu. Sehen wir zunächst davon

---

[1]) Diese Zeitschr. **41**, 386, 1912.

ab, daß bei der Umwandlung der Brenztraubensäure in Zucker eine Reduktion stattfinden muß, und berücksichtigen nur den direkt gemessenen Extrasauerstoff und die Kohlehydratzunahme und berechnen hieraus wie im vorigen Falle einen Oxydationsquotienten, indem wir zur gemessenen Zunahme noch die durch den Extrasauerstoff oxydierte Menge hinzurechnen und die Summe dividieren durch das oxydierte Kohlehydrat, so erhalten wir einen Quotienten, der auffallend mit dem bisher bestimmten Werte übereinstimmt. Im Durchschnitt ergibt sich 5,46 oder, bei Nichtberücksichtigung eines einzigen aus der Reihe herausfallenden, offenbar zu großen Wertes, die Zahl 4,7.

Bei den Versuchen benutzten wir meist frisch unter vermindertem Druck destillierte Säure (12 mm, 58° C). Doch hat scheinbar die bei längerem Aufbewahren der Säure erfolgende Kondensation keinen Einfluß auf das Resultat. In der Tabelle VIII ist eine Übersicht über

Tabelle VIII. Kohlehydratsynthese im Muskel durch Brenztraubensäure.

a) Sauerstoffmessungen.

Nr.	Datum	Muskelgewicht jeder Seite	Atmungszeit	cmm O_2 in den Kontrollmuskeln	cmm O_2 mit Brenztraubensäure	Extrasauerstoff mg	cmm O_2 pro g u. Std. in den Kontrollmuskeln
	1924						
1	8. XI.	1,48	21h30'	1320	1780	0,657	41,5
2	11. XI.	1,23	21	880	1288	0,584	34
3	12. XI.	1,44	16 45	970	1312	0,488	40
4	20. XI.	1,55	16 30	608	1137	0,756	25
5	24. XI.	1,39	17 30	622	1010	0,555	25,5
6	28. XI.	1,28	16 30	525	1040	0,737	25
7*)	15. XII.	1,07	15 30	515	867	0,504	31
	1925						
8*)	13. I.	1,50	15 30	588	982	0,564	25

*) Nur Glykogen bestimmt.

b) Kohlehydratmessungen und Bilanz.

Nr.	mg Kohlehydrat		Proz. Kohlehydrat		Kohlehydratsynthese berechnet Proz.	Kohlehydratsynthese mg	Kohlehydrat durch Extrasauerstoff verbrannt mg	(Bilanzmäßiger) Oxydationsquotient
	in den Kontrollmuskeln	in Muskeln mit Brenztraubensäure	in den Kontrollmuskeln	i. Muskeln mit Brenztraubensäure				
1	20,3	22,4	1,37	1,51	0,205	2,71	0,615	4,4
2	12,4	14,5	1,01	1,18	0,215	2,65	0,548	4,84
3	19,0	23,6	1,32	1,64	0,350	5,06	0,458	11,0
4	22,1	23,7	1,43	1,54	0,155	2,3	0,71	3,25
5	16,2	17,3	1,17	1,24	0,116	1,62	0,52	3,1
6	16,8	18,8	1,31	1,47	0,21	2,69	0,69	3,9
7*)	8,2	10,0	0,77	0,93	0,22	2,28	0,475	5,7
8*)	11,8	14,85	0,79	0,99	0,24	3,58	0,53	6,75
						Durchschnitt		5,46
						(abzügl. Vers.-Nr. 3:		4,7.)

*) Nur Glykogen bestimmt.

die Versuche gegeben, die genau so angeordnet sind wie die entsprechenden mit Milchsäure. Stets wurde etwa n/40 brenztraubensaures Natrium benutzt.

Bei der Synthese der Brenztraubensäure zu Zucker muß eine Reduktion stattfinden, sei es, daß man diesen Vorgang nach der folgenden Gleichung (1) oder (2) formuliert:

$$2\,C_3H_4O_3 + 2\,H_2O = C_6H_{12}O_6 + O_2. \qquad (1)$$

$$3\,C_3H_4O_3 + 3\,O = \underset{\text{(Acetaldehyd)}}{3\,C_2H_4O} + 3\,CO_2 + 3\,O = C_6H_{12}O_6 + 3\,CO_2 \qquad (2)$$

Infolgedessen muß mehr Kohlensäure entstehen, als Sauerstoff aufgenommen wird, und zwar für den Fall, daß die Synthese durch Verbrennung einer äquivalenten Menge Kohlehydrat gerade kompensiert würde, müßte der respiratorische Quotient in beiden Fällen = 1,2 sein; es ist dies in der Bilanz gleich der direkten Verbrennung der Brenztraubensäure. Im Falle einer Ansammlung von Kohlehydraten muß er noch größer sein. In unserem Falle wird Kohlehydrat im Überschuß synthetisiert; da jedoch die Ruheatmung gleichzeitig Kohlehydrat verbrennt, so ist die bilanzmäßige Kohlehydratzunahme nur gering. Der theoretisch zu erwartende Quotient sollte daher wenig über 1,2 liegen.

Bei der direkten Messung finden wir respiratorische Quotienten gegen 2,0, welche zeigen, daß außer der Reduktion noch weitere Kohlensäure abgespalten wird. In der Tat ergibt sich auch anaerob eine, wenn auch geringere Kohlensäurebildung aus Brenztraubensäure. Der Froschmuskel zeigt also dieselbe carboxylatische Spaltung, wie sie von *Neuberg* bei der Hefe entdeckt worden ist[1]).

Wieland[2]) hat kürzlich die Angabe gemacht, daß Froschmuskulatur bei physiologischen Temperaturen keine carboxylatische Spaltung der Brenztraubensäure zeigt, wobei er Versuche mit zerschnittenem Muskelgewebe ausgeführt hat. Diese Befunde können wir bestätigen. Zerschnittene Muskulatur zeigt keine carboxylatische Spaltung und auch keine oxydative Umwandlung der Brenztraubensäure. Es wird nicht mehr Kohlensäure gebildet, als Sauerstoff aufgenommen ist. Dies Vermögen ist vielmehr an die intakte Muskelstruktur geknüpft.

Es mögen hier zunächst einige Versuche über die Bildung von Extrakohlensäure bei Zusatz von Brenztraubensäure zu intakten Froschsartorien folgen. Benutzt sind stets ein bis zwei symmetrische Muskeln für Sauerstoff- und Kohlensäurebestimmung. Nur bei den Nr. 5 und 9 der Tabelle IX ist zerschnittene Muskulatur angewandt.

[1]) *Neuberg* und *Karczag*, diese Zeitschr. **36**, 60, 1911.
[2]) *Wieland*, Liebigs Ann. **486**, 232, 1924.

Tabelle IX.
Extrakohlensäurebildung in Gegenwart von Brenztraubensäure.

Nr.	Datum 1924	Muskelgewicht jeder Seite	Versuchszeit	Sauerstoffverbrauch cmm	CO_2 gebildet cmm	Respiratorischer Quotient	Extrakohlensäure pro g u. Std. cmm
			a) Versuche in Sauerstoff.				
1	12. XI.	0,17	16h	131	263,5	2,0	48,5
2	14. XI.	0,34	15	161	255	1,6	18,5
3	14. XI.	0,37	15 30′	306	740	2,4	76
4	25. XI.	0,36	4 30	89	170	1,9	50
5*)	4. XII.	0,25	3	255	251	1,0	0
			b) Versuche in Stickstoff.				
6	13. XI.	0,56	15h	—	73	—	9,0
7	15. XI.	0,34	3 30′	—	21	—	16
8	20. XI.	0,36	4 30	—	40,5	—	25
9*)	4. XII.	0,25	3	—	0	—	0

*) Zerschnittene Muskulatur.

Aus der Tabelle IX ersieht man, daß die Menge Extrakohlensäure in der Einheit von Zeit und Gewicht große Schwankungen zeigt, die zum Teil mit der verschieden großen Atmungssteigerung durch Brenztraubensäure zusammenhängen. Jedenfalls ist die Extrakohlensäure in Stickstoff erheblich geringer als in Sauerstoff. Zieht man die anaerobe Kohlensäure nach einem Durchschnittswert ab, so reduziert sich der respiratorische Quotient von etwa 2 auf etwa 1,5 bis 1,6. Aber auch dieser Wert ist noch größer, als er aus der bilanzmäßig bestimmten Zuckersynthese erwartet werden kann. Es scheinen daher noch weitere mit Kohlensäureabspaltung verbundene oxydative Nebenreaktionen stattzufinden, vielleicht von der Art der von *Wieland* an der Kohleoberfläche festgestellten: Während nämlich hier die Brenztraubensäure in Abwesenheit von Sauerstoff nicht zersetzt wird, wird sie in Gegenwart von Sauerstoff in Essigsäure und Kohlensäure gespalten.

Dasselbe ergibt sich auch aus der gleichzeitigen Titration der verschwindenden Brenztraubensäure. Würde die Reaktion ohne Nebenreaktionen ablaufen, müßte in jedem Falle, sowohl nach Gleichung (1) wie nach Gleichung (2) der Brenztraubensäureverbrauch das 1,2fache der bilanzmäßig gefundenen Zuckersynthese betragen, wie die folgende Rechnung zeigt. Man kann also nicht, wie es auf den ersten Blick scheint, auf diesem Wege zwischen den Gleichungen (1) und (2) entscheiden, indem im ersten Falle aus zwei Molekülen verschwindender Brenztraubensäure, im zweiten Falle aus drei Molekülen ein Molekül Zucker formelgemäß synthetisiert würde.

Ehe im folgenden einige Resultate mitgeteilt werden, in denen die Abnahme der Brenztraubensäure einmal mit dem synthetisierten

Zucker, das andere Mal mit der gebildeten Extrakohlensäure verglichen wird, sei das theoretisch zu erwartende Ergebnis berechnet. Hierzu muß der folgende Punkt berücksichtigt werden. Der gemessene Extrasauerstoff und die in der Tabelle X berechnete Synthese des Kohlehydrats stellen nicht den tatsächlichen „inneren" Mehrverbrauch an Sauerstoff und die „innere Synthese" dar. Denn der bei der Reduktion der Brenztraubensäure frei gewordene Sauerstoff, der nach außen nicht auftritt, muß noch hinzugezählt werden, und zwar wird nach Gleichung (1) pro synthetisiertes Zuckermolekül ein Molekül Sauerstoff eingespart: diesem entspricht aber $^1/_6$ Molekül mehr oxydierten Zuckers, der, da er in der Bilanz nicht erscheint, durch eine gleiche synthetisierte Menge kompensiert sein muß. Für diese wird wieder Sauerstoff eingespart und so fort. Haben wir mithin a synthetisierte Zuckermoleküle bilanzmäßig berechnet, so sind in Wirklichkeit $a\left(1 + \frac{1}{6} + \frac{1}{6^2} + \cdots \frac{1}{6^n}\right) = 1{,}2\,a$ synthetisiert worden, und ebenso $1{,}2\,a$ Moleküle Brenztraubensäure umgewandelt. Um die gleiche Molekülzahl muß aber auch der gemessene Extrasauerstoff vermehrt werden. Beträgt dieser b Moleküle, so ist der wahre Mehrverbrauch an Sauerstoff $b + 1{,}2\,a$. Bei der Gleichung (2) liegt die Sache etwas anders. Pro Molekül synthetisierten Zuckers sind hier $1\frac{1}{2}$ Moleküle Sauerstoff verbraucht, die aus dem Extrasauerstoff entnommen sind. Diesem entspricht somit nicht eine äquivalente Menge verbrannten Kohlehydrats. War der berechnete synthetisierte Zucker wiederum a Moleküle, der gemessene Extrasauerstoff b, so hat von diesem ein Betrag von $1\frac{1}{2} \cdot a$ Molekülen nicht zur Oxydation von Kohlehydrat gedient, und das oxydierte Kohlehydrat ist demnach nicht $\frac{b}{6}$, sondern nur $\frac{b}{6} - \frac{1{,}5\,a}{6}$. Das synthetisierte Kohlehydrat incl. des die Oxydation kompensierenden ist somit $a - \frac{1}{4}a$. Hierfür gilt wieder die gleiche Überlegung, so daß die Synthese schließlich $= a\left(1 - \frac{1}{4} + \frac{1}{4^2} - \frac{1}{4^3} + \cdots \frac{1}{4^n}\right) = 0{,}8\,a$ ist. Entsprechend ist aber auch der für die Leistung der Synthese aufgewandte Sauerstoff nicht b Moleküle, sondern $b - 1\frac{1}{2} \cdot 0{,}8\,a = b - 1{,}2\,a$ Moleküle. Endlich ist der Brenztraubensäureschwund $= {}^3/_2 \cdot 0{,}8\,a = 1{,}2\,a$. Der „wahre Oxydationsquotient" nach Gleichung (1) wäre

$$6 \cdot \frac{1{,}2\,a}{b + 1{,}2\,a}$$

und nach Gleichung (2):

$$6 \cdot \frac{0{,}8\,a}{b - 1{,}2\,a}.$$

Für den Brenztraubensäureverbrauch im Vergleich zur Zuckersynthese ergibt sich nun nach beiden Gleichungen derselbe Wert, nämlich das 1,2fache der bilanzmäßig berechneten Zuckersynthese. Man sieht daraus, daß auch auf diesem Wege eine Entscheidung, welche von den beiden Gleichungen zutrifft, nicht gefunden werden kann.

Methodik.

Die Titration der Brenztraubensäure geschah nach den von *Wieland* gegebenen Vorschriften, jedoch mit n/100 Jodlösung. Für 1 Mol. Brenztraubensäure werden 6 Äquivalente Jod unter Jodoformbildung verbraucht. 1 ccm n/100 Jod = 0,146 mg Brenztraubensäure.

Da zerschnittene Muskulatur Brenztraubensäure nicht umsetzt, wurde sie zur Ermittlung der Verteilung der Brenztraubensäure zwischen Lösung und Muskulatur benutzt. Es ergab sich so, daß die Brenztraubensäure sich auf die Muskulatur ebenso verteilt wie auf Wasser: 10 ccm Brenztraubensäure-Ringerlösung verbrauchten direkt 17,1 n/100 Thiosulfat, nach längerem Schütteln mit 4 g Muskulatur und Enteiweißung 12,2 ccm n/100 Thiosulfat. $12{,}2 \cdot \frac{14}{10} = 17{,}1$.

In der Tabelle X ist der aus der Zuckersynthese oder aus der Extrakohlensäure berechnete Verbrauch an Brenztraubensäure mit dem durch Titration ermittelten verglichen worden. Man sieht aus der Tabelle, daß in der Tat die verschwindende Brenztraubensäure sich bei der Titration stets größer ergibt, als sie aus dem synthetisierten Kohlehydrat oder aus der Extrakohlensäure allein berechnet wird. Immerhin ist der Unterschied nicht beträchtlich und bei der Kohlehydratsynthese obendrein die anaerobe Kohlensäure nicht mit berücksichtigt. Die beschriebenen Reaktionen stellen daher jedenfalls den hauptsächlichen Umsatz dar, den die Brenztraubensäure in Gegenwart des Muskels erfährt.

Tabelle X.

Titrierter Schwund der Brenztraubensäure im Vergleich zur Kohlehydratsynthese bzw. Extrakohlensäure.

Nr.	Datum 1924	Muskelgewicht	Flüssigkeitsmenge	Versuchsdauer	Atmosphäre	Gefundene Kohlehydratzunahme mg	Extrakohlensäure mg
1	20. XI.	1,5	4,5	15h	O_2	2,3	—
2	24. XI.	1,39	4,5	17 30′	O_2	1,62	—
3	28. XI.	1,28	4,5	16 30	O_2	2,69	—
4	15. XII.	1,07	4,5	15 30	O_2	2,3	—
5	25. XII.	0,36	1,5	4 30	N_2	—	0,087
6	25. XII.	0,36	1,5	4 30	O_2	—	0,162

Tabelle X (Fortsetzung).

Nr.	Datum 1924	Daraus Brenztraubensäureschwund berechnet mg	Pro 1 ccm Lösg. gefund. n/100 Jod vorher ccm	n/100 Jod vorher nach Ausgleich berechnet ccm	Pro 1 ccm n/100 Jod gefunden nachher ccm	Brenztraubensäure verschwunden titrimetrisch mg
1	20. XI.	**2,75**	9,8	7,35	3,45	**3,43**
2	24. XI.	**1,94**	9,85	7,52	3,65	**3,38**
3	28. XI.	**3,24**	11,02	8,6	4,13	**3,80**
4	15. XII.	**2,76**	14,4	11,6	6,45	**4,2**
5	25. XII.	**0,172**	10,2	—	8,95	**0,285**
6	25. XII.	**0,324**	8,2	—	6,85	**0,367**

IV. Die Energetik der Kohlehydratsynthese im Muskel.

Für die Umwandlung der von außen zugesetzten Milchsäure in Glykogen gelten dieselben Betrachtungen, wie sie früher für den oxydativen Erholungsprozeß angestellt sind. Verschwindet die Milchsäure aus einer durch Phosphat (oder Bicarbonat) gepufferten Lösung und wandelt sich in Glykogen um, so kommt hierfür nur die endotherme Reaktion verdünnte Milchsäure ⟶ Glykogenhydrat in Ansatz, die pro 1 g —180 Cal beträgt[1]), und die negative Umsatzwärme der Milchsäure mit Phosphat oder Bicarbonat —20 Cal. Verschwände das Lactat allein im Muskel, so würde an die Stelle der Umsatzwärme des Phosphats die Dissoziationswärme des Proteins treten. In geringem Maße trifft ähnliches zu, wenn die Milchsäure aus dem Blute in den Muskel übertritt, da auch das Plasmaeiweiß bis zu einem bestimmten Umfange an der Pufferung des Blutes teilnimmt.

Eine besondere Aufgabe stellt die Energetik der Kohlehydratsynthese aus Brenztraubensäure dar, weil diese mit einer Reduktion einhergeht. Die notwendige Arbeit hierfür wird durch die Oxydationsenergie geleistet, gleichviel, ob wir die Gleichung (1) zugrunde legen, wo die gleichzeitige Oxydation von Kohlehydrat die Energie liefert, oder die Gleichung (2), wo die Oxydation des Acetaldehyds, der selbst als Reduktionsprodukt der Brenztraubensäure anzusehen ist, unmittelbar zu Zucker führen würde. Um die Größe des notwendigen Arbeitsaufwandes zu kennen, müssen die Verbrennungswärme und die Verdünnungs- und Neutralisationswärme der Brenztraubensäure bekannt sein. Aus diesem Grunde hat Herr *Blaschko* sie auf unsere Veranlassung bestimmt und wird über seine Messungen selbst in dieser Zeitschrift berichten. Die Verbrennungswärme ergab sich pro 1 g wasserfreier reiner Säure, frisch im Vakuum destilliert und bei niederer Temperatur im Hochvakuum getrocknet, zu 3172,4 Cal oder 279000 Cal pro Molekül. Die Verdünnungswärme der konzentrierten Säure auf n/20 ergab sich

[1]) Vgl. *Rolf Meier* und *Otto Meyerhof*, diese Zeitschr. **150**, 233, 1924.

durchschnittlich zu 51,7 Cal pro Gramm bzw. 4,550 Cal pro Molekül. Als Neutralisationswärme der verdünnten Säure erhielt er pro Molekül 11,540 Cal[1]).

Die Reaktionsgleichung (1) ergibt danach die folgende Wärme:

$$2\,C_3H_4O_3\,aq.(2 \times 274{,}5\,Cal) + 2\,H_2O = C_6H_{12}O_6\,(Glykogenhydrat\ 681\,Cal).$$

Für 36 mg O_2 werden somit 132 Cal verbraucht, pro Milligramm Sauerstoff 3,67, pro Kubikzentimeter 5,25. Würde diese Synthese durch Oxydation von Glykogen bestritten, so ergibt sich hierfür:

$$C_6H_{12}O_6\,(Glykogenhydrat) + 6\,O_2 = 6\,CO_2 + 6\,H_2O + 681\,Cal;$$

also pro Milligramm O_2 3,55, pro Kubikzentimeter 5,07 Cal.

Es folgt daraus, daß ein für die Oxydation von Glykogen verbrauchtes Molekül Sauerstoff fast genau die Energie frei macht, die für die Einsparung eines Sauerstoffmoleküls bei der Synthese des Glykogens aus Brenztraubensäure aufgewandt wird. Danach kann theoretisch, solange überhaupt ein nach außen erkennbarer Mehrverbrauch an Sauerstoff stattfindet, dieser die Energie für eine nahezu beliebig große Umwandlung von Brenztraubensäure in Glykogen liefern.

Wenn in der Bilanz die Kohlehydratsynthese aus Brenztraubensäure gerade eine äquivalente Verbrennung von Kohlehydrat kompensiert, so beträgt die Wärmetönung pro Kubikzentimeter Sauerstoff 4,92 anstatt 5,07 Cal. Es müßte also schon eine sehr starke bilanzmäßige Zunahme des Kohlehydrats stattfinden, um in der Verringerung der Oxydationswärme in Erscheinung zu treten. Dagegen kann, wenn der Prozeß sich allein im Muskel abspielt, ebenso wie bei der Milchsäure noch eine endotherme Dissoziationswärme des Eiweißes hinzutreten, da Säureanionen in neutrale Körper verwandelt werden.

Lassen wir die Reaktion nach Gleichung (2) ablaufen, so bedürfen wir noch der Kenntnis der Verbrennungswärme gelösten verdünnten Acetaldehyds. Für reinen Acetaldehyd fanden *Berthelot* und *Delépine*[2]) eine Verbrennungswärme von 279,300 Cal (konstanter Druck). Die

---

[1]) Eine Bestimmung der Verbrennungswärme der Brenztraubensäure ist bisher nicht publiziert worden, doch nehmen die Herren *Aubel* und *Wurmser* in Paris in verschiedenen energetischen Berechnungen (Soc. Scient. d'Hygiene Aliment. **12**, Nr. 4 und 7, 1, 1924) Bezug auf diese Größe und teilten dem einen von uns (*O. Meyerhof*) brieflich mit, daß der von ihnen benutzte Wert aus einer persönlichen Mitteilung von *Henri* stamme, der eine Bildungswärme von 155,8 Cal pro Mol. bestimmt hätte. Dies würde 3005 Cal Verbrennungswärme pro 1 g sein. Die Verdünnungswärme der Säure ist bereits von *Massol*, Bull. Soc. Chim. (3) **33**, 336 und *Simon*, ebendaselbst (3) **9**, 836 bestimmt worden zu 4280 und 4400 Cal, die Neutralisationswärme von dem letzteren zu 11 000 Cal pro Mol.

[2]) Siehe *Landolt-Börnstein*, 5. Aufl., **2**, 1597.

Lösungs- und Verdünnungswärme auf 0,4 Proz. (n/10) bestimmte Herr *Blaschko* in unserem Laboratorium zu + 4480 Cal pro Molekül. Also ergeben sich für gelösten Acetaldehyd 274,800 Cal. Die Reaktion Brenztraubensäure aq. (274,5 Cal) = Acetaldehyd aq. (274,8 Cal) + CO_2 muß daher ohne meßbare Wärmetönung verlaufen, wie es in der Tat von *Neuberg*[1]) kürzlich mitgeteilt wurde. Dann gilt die Gleichung: 3 Acetaldehyd aq. (274,8 × 3 Cal) + 3 O = Glykogenhydrat aq. (681 Cal) + 144 Cal. Für 1 mg Sauerstoff also 3,0 Cal, für 1 ccm 4,29 Cal. Die Verbrennungswärme ist also etwas kleiner, als es bei der Oxydation von Kohlehydrat der Fall wäre. Doch muß sich bei gleichzeitigem Fortbestehen der Ruheatmung derselbe Mittelwert des kalorischen Koeffizienten des Sauerstoffs ergeben, wie im Falle der Gleichung (1) bei gleichem Aufwand von Extrasauerstoff. Dies folgt notwendig aus der oben dargelegten bilanzmäßigen Übereinstimmung, die eine energetische Gleichheit der Gesamtreaktion zur Folge hat. Nur könnte bei der Gleichung (2) der ganze Extrasauerstoff so gedeutet werden, daß es ausschließlich diejenige Sauerstoffmenge wäre, die für die Oxydation des Acetaldehyds zu Zucker benötigt würde. Pro synthetisierten Zuckermoleküls wäre das 1,5 Molekül Sauerstoff. Das entspricht aber in unserer Rechnung einem bilanzmäßigen Oxydationsquotienten von 4,0, wie man ihn tatsächlich etwa findet. Gleichwohl möchten wir die Formulierung der Gleichung (1) vorziehen, bei der vermutlich die Brenztraubensäure intermediär zu Milchsäure reduziert wird. Der Oxydationsquotient hat dann in beiden Fällen der Kohlehydratsynthese dieselbe Bedeutung.

Diese Reduktion der Brenztraubensäure spielt vielleicht bei der Umwandlung der Aminosäuren in Zucker eine gewisse Rolle. Daß das Alanin im Muskel unwirksam ist, könnte möglicherweise nur daran liegen, daß es nicht eindringt, oder die Leber ist für diese Desaminierung erforderlich. Im sechsten Kapitel werden wir sehen, daß die Leber offenbar den gleichen hier beschriebenen Mechanismus besitzt, um nicht nur aus Milchsäure und Brenztraubensäure, sondern auch aus Alanin und Asparagin Zucker zu bilden, wodurch auf die zuerst von *Embden* und *Salomon*[2]) im pankreaslosen Hund beobachtete Umwandlung von Alanin und Asparagin in Traubenzucker ein neues Licht fällt.

V. Atmung und Kohlehydratsynthese des Warmblütermuskels.

Auf Grund der am Kaltblüter gewonnenen Erfahrungen ist es leicht, die gleichen Vorgänge am Warmblütermuskel nachzuweisen

---

[1]) *Neuberg*, diese Zeitschr. 152, 205, 1924.

[2]) *Hofmeisters* Beiträge 5, 507, 1904; 6, 63, 1905.

und dabei in den Chemismus des Atmungsprozesses noch etwas näher einzudringen. Als zum Studium des Atmungsvorgangs geeigneter Warmblütermuskel erweist sich wegen seiner geringen Schichtdicke das Zwerchfell kleiner und mittelgroßer Ratten, das auch außerhalb des Körpers eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff gestattet[1]). In der Arbeit von *O. Meyerhof* und *H. E. Himwich* ist eine große Anzahl von Messungen mitgeteilt, aus denen sich ergibt, daß in dem günstigsten Milieu, einem schwach alkalischen Ringer-Phosphatgemisch, die Atmung des Zwerchfells großer ausgewachsener Ratten 1,1 ccm O_2 pro Gramm Frischgewicht und Stunde oder 6,0 ccm pro Gramm Trockengewicht und Stunde beträgt, die Atmung des Zwerchfells kleiner Ratten (55 bis 80 g) 1,8 ccm pro Gramm Frischgewicht = 10,0 ccm pro Gramm Trockengewicht. Diese Atmungsgröße ist für einige Zeit konstant. In Fortsetzung dieser Versuche ergab sich in einer neuen Serie, bei der wir ausschließlich das Zwerchfell mittelgroßer Ratten (etwa 100 g) verwandten, ein Wert von 7,0 ccm O_2 pro Gramm Trockengewicht und Stunde. Die Atmungsgröße ist unter diesen Umständen für etwa 2 bis 3 Stunden nahezu konstant, sinkt aber dann allmählich ab. Der Abfall scheint noch stärker zu sein bei Benutzung von Ratten, die 2 bis 3 Tage vor dem Versuch gehungert haben, und diese haben wir fast ausschließlich zu den Versuchen benutzt. Es wurden dieselben Stoffe geprüft wie in den vorigen Abschnitten daraufhin, ob sie die Atmung erhöhen oder einen Atmungsabfall verhindern können. Von sämt-

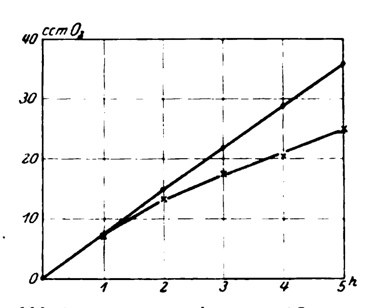


Abb. 1. •——•——• Atmungsgröße mit, ×——×——× ohne Milchsäurezusatz (Rattenzwerchfell). ccm Sauerstoff pro g Trockensubstanz.

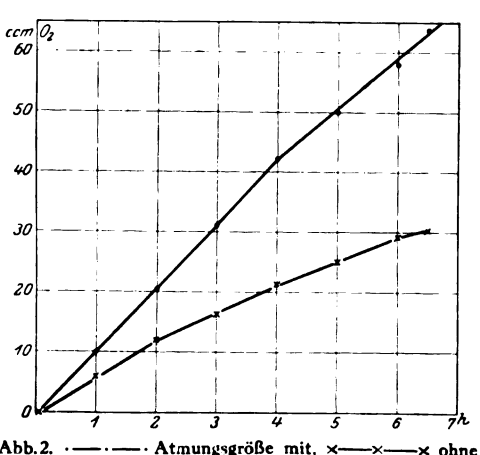


Abb. 2. •——•——• Atmungsgröße mit, ×——×——× ohne Brenztraubensäure (Rattenzwerchfell). ccm Sauerstoff pro g Trockensubstanz.

[1]) *Warburg, Negelein* und *Posener*, Klin. Wochenschr. **3**, 1062, 1924; *Otto Meyerhof* und *H. E. Himwich*, Pflügers Arch. **205**, 415, 1924.

lichen dieser Stoffe gaben wiederum nur Milchsäure und Brenztraubensäure ein sicheres positives Resultat. Der Traubenzucker kann zwar den Atmungsabfall häufig verringern, aber erhöht nicht die anfängliche Atmungsgröße. Milchsäure dagegen und in noch höherem Grade Brenztraubensäure steigern diese unmittelbar, wenn auch nicht sehr stark, und diese gesteigerte Atmung bleibt nun für die ganze Versuchsdauer von 4 bis 6 Stunden nahezu oder auch vollkommen konstant, so daß die Differenz gegen den Kontrollversuch ohne Zusatz dauernd größer wird. Dies ist für je einen Versuch mit Milchsäure und Brenztraubensäure in den Abb. 1 und 2 dargestellt und in der Tabelle XI für eine größere Versuchsreihe.

Um die Versuche bei 37° für längere Zeit ohne Gefährdung durch Bakterien fortsetzen zu können, wurde bei Herstellung der Lösungen, Entnahme des Zwerchfells und Vorbereitung der Atmungsgläschen annähernd steril gearbeitet. Die Versuche selbst lassen sich zwar nicht steril durchführen. Doch waren die getroffenen Vorsichtsmaßregeln ausreichend, um während der ganzen Versuchsdauer Störungen durch Bakterien zu verhindern. In der Tabelle XI ist eine Reihe von Atmungswerten angegegen, berechnet auf Kubikzentimeter O_2 pro Gramm Trockengewicht und Stunde (nach dem Vorschlag von *Otto Warburg* Q_{O_2} genannt), und hierbei sind die stündlichen Q-Werte sowohl für die erste Stunde wie für die Gesamtzeit berechnet. Man sieht, daß besonders für die letztere der Unterschied erheblich ist und daß vor allem bei Brenztraubensäure der Atmungsabfall nahezu ausbleibt. Die Versuche jeder Nummer sind mit Stücken desselben Zwerchfells ausgeführt. Die verschiedenen Reihen sind nicht ohne weiteres miteinander vergleichbar, da die absolute Atmungsgröße mit dem Gewicht des Tieres, wohl auch mit dem Ernährungszustand und zum Teil mit der Art der Präparation variiert. (Während der Präparation und Vorperiode muß eine Abkühlung möglichst vermieden werden, da hierdurch die Atmung geschädigt wird.) Dagegen sind, wie Kontrollen erweisen, die Q-Werte an Stücken desselben Zwerchfells in übereinstimmendem Milieu nahezu gleich. Z. B. wurden erhalten in 2½ Stunden:

1.	8,0	mg Trockengewicht;	125 cmm	O_2;	Q_{O_2} 6,25
2.	10,7	„ „	163 „	O_2;	Q_{O_2} 6,1
3.	8,18	„ „	124 „	O_2;	Q_{O_2} 6,05
4.	9,65	„ „	137 „	O_2;	Q_{O_2} 5,7

Übrigens sind die Q-Werte ein wenig zu groß, weil im Laufe der Zeit durch Auslaugung ein allmählicher Gewichtsverlust des Zwerchfells in den Atmungsgläschen stattfindet. Dieser beträgt in 5 bis 6 Stunden 15 bis 20 Proz. Die Konzentrationen der Milchsäure und Brenztraubensäure waren stets etwa 0,02 n und des Traubenzuckers 0,01 n.

Tabelle XI.

Steigerung der Zwerchfellatmung durch Milchsäure.

Nr.	Datum 1924/25	Gewicht der Ratte g	Zusatz	Zeitdauer	Q_{O_2} ohne Zusatz		Q_{O_2} mit Zusatz	
					für die erste Stunde	für die Gesamtzeit	für die erste Stunde	für die Gesamtzeit
1	8. XI.	80	Milchsäure	5h	5,45	4,6	**7,91**	**7,81**
			Traubenzucker				5,56	5,56
2	11. XI.	104	Milchsäure	3	5,0	4,7	**10,2**	**9,74**
			Traubenzucker				7,3	7,16
3*)	14. XI.	100	Milchsäure	4 30'	7,9	6,5	**8,8**	**7,3**
			Traubenzucker				7,1	6,5
4*)	30. XI.	110	Milchsäure	5	6,1	3,75	**6,85**	**5,52**
5	5. XII.	100	Milchsäure	5	7,22	5,28	**7,88**	**6,93**
			Traubenzucker				5,86	5,08
			Durchschnitt		**6,33**	**4,97**	**8,12** mit Milchsäure	**7,46**
			Steigerung durch Brenztraubensäure.					
1	14. XI.	100	Brenztraubensäure	4h30'	7,9	6,5	**10,55**	**10,4**
2	1. XII.	110	„	5 30	8,25	6,7	**9,8**	**9,3**
3	2. XII.	110	„	5	8,0	7,1	**8,8**	**9,1**
4	5. XII.	95	„	6 30	6,16	4,78	**10,2**	**10,65**
5	8. XII.	etwa 100	„	4	5,7	4,68	**8,7**	**8,25**
6	11. I.	105	„	5 20	7,76	7,85	**11,0**	**10,77**
			Durchschnitt		**7,29**	**6,12**	**9,84** mit Brenztraubensäure	**9,74**

*) Ringerbicarbonat.

Daß die Atmungssteigerung der Ausdruck für einen Umsatz der wirksamen Substanzen ist, kann man wenigstens für die Brenztraubensäure an der Bildung der Extrakohlensäure beweisen. Auch hier wieder unterliegt die Brenztraubensäure bereits anaerob einer carboxylatischen Spaltung, doch ist die hierbei auftretende Kohlensäure nur ein Bruchteil derjenigen, die von demselben Zwerchfellstück in Sauerstoff als Extrakohlensäure abgegeben wird. Man erhält hier einen respiratorischen Quotienten von etwa 1,2, wie es der Verbrennung von Brenztraubensäure entspricht. In der Tabelle XII sind zwei derartige Versuche mitgeteilt, wo sowohl die aerobe wie anaerobe Kohlensäure sowie der Sauerstoffverbrauch in Gegenwart von Brenztraubensäure gemessen sind. Für die Messung des Sauerstoffverbrauchs und der aeroben Kohlensäure wurden drei Zwerchfellstücke benötigt, das angegebene Gewicht entspricht dem zur Sauerstoffmessung benutzten Muskelstück, die Kohlensäure ist auf die gleiche Gewichtsmenge Muskulatur umgerechnet.

Tabelle XII.

Extrakohlensäurebildung im Zwerchfell in Gegenwart von Brenztraubensäure.

Nr.	Datum 1924/25	Zwerchfell-Trocken-substanz mg	Versuchs-zeit	Atmo-sphäre	O_2-Ver-brauch cmm	Kohlen-säure-bildung cmm	Respi-ratorischer Quotient	Extra-kohlensäure pro mg Trockengew. und Std. cmm	Q_{O_2}
1	8. XII.	5,74	4h	O_2	189	228	1,2	1,7	8,25
		5,45	4	N_2	—	13	—	0,6	—
2	7. I.	8,48	4	O_2	263	326	1,24	1,85	9,37
		6,12	4	N_2	—	7,5	—	0,3	—

Während nun die Anwesenheit der Brenztraubensäure unter natürlichen Umständen im Muskel nicht nachzuweisen ist, ist dies für die Milchsäure anders. Ja, die im intakten Muskel vorhandene Ruhemilchsäure ist in dem ausgeschnittenen Zwerchfellstück infolge der unvermeidlichen Verletzung sowie der bei der Präparation bestehenden Anaerobiose stets gesteigert, und man erhält daher Anfangswerte von 0,15 bis 0,20 Proz. Milchsäure, bezogen auf das Frischgewicht des Muskels. Da nun ein Diffusionsausgleich dieser Milchsäure nur sehr unvollkommen erfolgt, ist die Milchsäurekonzentration im ausgeschnittenen Zwerchfellstück zweifellos höher, als dies in vivo der Fall ist. Und diese vermehrte Milchsäure schwindet zu einem großen Teil im Verlauf des Atmungsversuchs, wofür das folgende Beispiel gegeben sei:

Versuch 1: Drei Zwerchfellhälften von Ratten, 0,540 g Frischgewicht, enthalten 0,89 mg Milchsäure = 0,165 Proz. Die symmetrischen drei Hälften, 0,631 g, enthalten nach fünfstündiger Atmung 0,40 mg Milchsäure = 0,063 Proz. Verbrauch 0,102 Proz. oder in den Versuchsmuskeln 0,643 mg Milchsäure, was einem Sauerstoffverbrauch von 480 cmm entspricht, während im ganzen 2760 cmm Sauerstoff verbraucht sind. Es kommen also 18 Proz. des Sauerstoffs auf die verschwundene Milchsäure.

Es spielt sich demnach schon an und für sich derjenige Vorgang im ausgeschnittenen Zwerchfell ab, den wir durch äußeren Zusatz der Milchsäure beschleunigen, und man versteht daher, daß der Unterschied der Oxydationsgeschwindigkeit zu Beginn hierbei oft sehr gering ist (s. Abb. 1) und erst dann steigt, wenn diese spontan entstandene Milchsäure durch Resynthese zu einem großen Teile geschwunden ist. Aus dieser Überlegung folgt, daß die Atmung des ausgeschnittenen Zwerchfells aus diesem Grunde höher sein muß, als sie unter gleichen Umständen in vivo im intakten Muskel sein würde. Wieweit dieser Einfluß durch den Einfluß des Serums ersetzt wird, muß dahingestellt bleiben. Jedenfalls erhöht dieses (inaktiviertes Pferde-

serum) die Atmung des ausgeschnittenen Zwerchfells nicht, während es die der Leber steigert (s. unten).

Schließlich zeigt auch die Bestimmung der Kohlehydrate im Zwerchfell vor und nach der Atmung, daß zwar keine sichere Vermehrung derselben in Anwesenheit von Milchsäure und Brenztraubensäure zu beobachten ist, daß aber ein verringerter Schwund gegenüber den Kontrollmuskeln vorliegt trotz der gesteigerten Atmung. Diese Befunde könnten zwar für sich allein, ebenso wie der respiratorische Quotient von 1,2 bei Brenztraubensäure, als eine direkte Verbrennung gedeutet werden. In Verbindung mit den Ergebnissen am Froschmuskel wird man aber die Erklärung bevorzugen, daß die Atmungssteigerung der Ausdruck derselben Kohlehydratsynthese ist wie dort, und daß Milchsäure und Brenztraubensäure erst nach Synthese zu Zucker verbrannt werden.

Zur Messung der Kohlehydrate in Zwerchfellstücken von 5 bis 10 mg Trockengewicht modifizierten wir die bisher geübten Methoden zur Bestimmung des Glykogens und der niederen Kohlehydrate und titrierten den Zucker nach der Hydrolyse nach *Hagedorn-Jensen*, worüber später genauer berichtet wird. In einigen Fällen wurde gleichzeitig die Milchsäure bestimmt. Dann verwandten wir zwei bis drei Rattenzwerchfelle zusammen. Die Frischgewichte von Zwerchfell- und Leberschnitten wurden auf einer Torsionswage von *Hartmann* und *Braun* (Meßbereich 0 bis 100 mg), die Trockengewichte auf einer Mikrowage von *Sartorius* bestimmt.

Daß Milchsäure und Brenztraubensäure nach Umwandlung in Zucker im Muskel oxydiert werden, ergibt sich schließlich mit Wahrscheinlichkeit auch aus einer weiteren Versuchsreihe, in der wir die Abspaltung des Ammoniaks untersucht haben. Der Vergleich des Kohlehydratschwundes mit dem Sauerstoffverbrauch bei der Ruheatmung des Zwerchfells zeigt nämlich, daß die Atmung nicht wie beim ausgeschnittenen Froschmuskel auf *ausschließlicher* Oxydation des Kohlehydrats beruhen kann. In der Tat wird bei der Atmung des Zwerchfells, wenn es in reiner Ringer-Phosphatlösung suspendiert ist, konstant Ammoniak abgespalten, besonders wenn die Ratten 2 bis 3 Tage gehungert hatten. Diese Ammoniakabspaltung bleibt nahezu aus, wenn man zur Lösung 0,2 Proz. Traubenzucker zusetzt. Das Verhalten des Muskels ähnelt danach dem, wie es *Warburg*, *Negelein* und *Posener*[1]) bei anderen Organen in Abwesenheit von Zucker gefunden haben. Auch wurde bei ihnen die starke Ammoniakausscheidung des Carcinomgewebes und der Retina durch Stickstoff auf etwa die Hälfte herabgesetzt. Im Muskel ist bei Abwesenheit von Oxydationen (Stickstoff oder Zusatz von n/1000 KCN zur Ringerlösung) die Ammoniakabspaltung ähnlich, manchmal noch stärker herabgesetzt und darf

[1]) Diese Zeitschr. **152**, 309, 1924.

daher wohl zur Hauptsache als Ausdruck der Eiweißoxydation aufgefaßt werden. Rechnet man, daß durchschnittlich bei der Eiweißverbrennung auf 8 bis 10 Atome verbrauchten Sauerstoffs ein Molekül NH_3 abgespalten werden, so ist die Eiweißverbrennung allerdings nicht erheblich, sondern würde nur etwa 10 Proz. der Atmung ausmachen. (Zur direkten Abspaltung von NH_3 tritt noch solcher, der durch Soja-Urease frei gemacht wird (Harnstoff). Dessen Zunahme bei der Atmung beträgt ungefähr die Hälfte der direkten NH_3-Bildung, so daß danach etwa 15 Proz. der Atmung auf Eiweiß entfallen). Diese Ammoniakabspaltung aber wird ebenso wie durch Traubenzucker auch durch Milchsäure und Brenztraubensäure sehr stark herabgesetzt, noch stärker als durch KCN bzw. Stickstoff, während atmungsunwirksame Stoffe, wie Alanin, Asparagin und Glycerinsäure nahezu ohne Einfluß sind. Dies ist besonders bei Alanin und Asparagin bemerkenswert, weil eine Desaminierung derselben eine starke Steigerung der Ammoniakbildung hervorrufen würde, wie wir es in der Tat in der Leber finden (s. Kapitel VI). Andererseits verdrängen offenbar Milchsäure und Brenztraubensäure auf dem Wege über Zucker das Eiweiß aus der Verbrennung.

Methodik.

Die Ammoniakbestimmungen nahmen wir nach der *Folin*schen Vorschrift für kleine Ammoniakmengen vor, wobei wir ähnlich den Angaben von *Warburg*, *Negelein* und *Posener* verfuhren. Stets wurde außer der Flüssigkeit auch das Gewebsstück mit auf Ammoniak bearbeitet, indem es in n/10 Salzsäure (für forensische Zwecke, ammoniakfrei) rasch zerdrückt wurde. Die Suspension wurde dann mit Natriumwolframat versetzt und unter weiterer Zugabe von HCl kongosauer gemacht und auf 10 ccm aufgefüllt. Nach Abzentrifugieren wird ein aliquoter Teil der Flüssigkeit in den *Folin*schen Kolben gefüllt, nach Vorschrift mit Natriumcarbonat alkalisiert und das Ammoniak in eine Vorlage übergetrieben. Die Nesslerisierung geschah in einem *Dubosq*schen Kolorimeter mit *Lummer-Brodhun*schem[1]) Würfel mit Tageslichtlampe. Die Genauigkeit beträgt bei unseren Mengenverhältnissen etwa 5 bis 8 Proz. der Messungen.

Der Anfangsgehalt des Zwerchfells von Hungerratten an Ammoniak ist ziemlich konstant und beträgt 0,20 bis 0,25 10^{-6} g NH_3 pro Milligramm Trockengewicht. Unter Zugrundelegung dieses Anfangsgehalts wurde die Ammoniakzunahme am Versuchsende festgestellt und pro Gramm und Stunde berechnet. In reiner Ringerlösung beträgt die stündliche Ammoniakbildung 0,04 bis 0,10 mg pro Gramm Trockengewicht und Stunde, bei 5 bis 10 mg Sauerstoffverbrauch pro Gramm und Stunde. Um die Ammoniakabspaltung mit dem Sauerstoffverbrauch zu vergleichen, berücksichtigten wir, daß bei reiner Eiweißverbrennung pro 10 mg Sauerstoff (= 7 ccm), wie es ungefähr dem Q_{O_2}-Wert unserer Ver-

[1]) S. Abderhaldens Handb. d. biochem. Arbeitsmethoden 1, 650.

suche entspricht, 1 mg NH_3 abgespalten werden müßte, während wir nur ein Zehntel hiervon finden. Bei gefütterten Ratten ist die NH_3-Abspaltung noch erheblich geringer. In diesen Versuchen wurden die Zwerchfellstücke feucht vor Beginn des Atmungsversuchs gewogen, um eine Ammoniakabspaltung beim Trocknen zu verhindern. Daher werden die Q-Werte relativ etwas zu klein, weil in den übrigen Versuchen in 4 bis 6 Stunden ein Gewichtsverlust von

Tabelle XIII.

Ammoniakabspaltung im Rattenzwerchfell bei der Atmung.

Nr.	Datum 1925	Feuchtgewicht vorher mg	NH_3-Gehalt vorher 10^{-6} g	NH_3-Gehalt pro mg Trockengewicht 10^{-6} g	Versuchszeit	Zusätze	Atmungsmuskel Feuchtgewicht mg	Ammoniak in Versuchszeit gebildet 10^{-6} g	NH_3 pro g Trockengewicht und Stunde mg	Sauerstoffverbrauch cmm	Q_{O_2}
1	5. II.	67	3,0	0,250	4h 30′	—	57	4,95	0,106	313	6,72
						Traubenzucker	50	0,25	0,005	234	5,72
						Milchsäure	60	0,6	0,012	288	5,88
						Brenztraubensäure	52	1,15	0,027	275	6,48
2	6. II.	28,0	1,26	0,250	6	—	87	3,1	0,105	129	4,4
						KCN	37	1,5	0,037	—	—
						Traubenzucker	36	1,2	0,030	232	5,85
						Brenztraubensäure	34,4	0,7	0,017	310	8,97
3	10. II.	51	2,1	0,245	5 30	—	51	3,0	0,060	233	4,55
						Brenztraubensäure	53	0,4	0,008	314	5,95
4	11. II.	35,8	1,35	0,21	5	—	33	2,15	0,072	242	8,08
						Brenztraubensäure	33	0,65	0,022	344	11,5
5	13. II.	40	2,0	0,270	6	—	52	2,4	0,042	177	3,13
						—	44	2,1	0,044	110	2,3
						—	41	3,05	0,068	111	2,45
						KCN	38	0,4	0,009	—	—
						Milchsäure	46	0,10	0,002	265	6,4
6	16. II.	46	1,95	0,23	5 30	—	28	2,55	0,091	174	6,2
						Milchsäure	39	0,85	0,025	315	7,5
						Alanin	39	2,35	0,070	244	6,25
7	17. II.	—	—	—	4 50	—	38	2,2	0,060	296	8,1
						Glycerinsäure	51,9	1,5	0,032	369	7,4
8	18. II.	—	—	—	5	—	37	2,4	0,071	203	6,0
						Brenztraubensäure	48	1,55	0,035	332	7,6
9	20. II.	62	1,7	0,155	2 30	—	44	1,3	0,065	125	6,25
					2 30	—	59	1,0	0,04	163	6,1
					5	—	45	2,35	0,057	220	5,38
					5	—	53	1,85	0,040	267	5,55
10	23. II.	—	—	—	5 30	—	74,4	6,24	0,084	249	3,3
						Glycerinsäure	74,8	5,45	0,074	248	3,3
						Asparagin	84,8	8,05	0,095	195	2,3
						Asparagin + KCN	71,4	5,5	0,077	—	—

15 bis 20 Proz. stattfindet, der hier nicht berücksichtigt ist. Daß die Ammoniakabspaltung regelmäßig erfolgt, ist in dem Doppelversuch 9 der Tabelle XIII zu sehen. Es wird hier durchschnittlich in den zweiten $2\frac{1}{2}$ Stunden ebensoviel NH_3 abgespalten wie in den ersten.

VI. Vergleichende Versuche über die Atmung und Kohlehydratsynthese der Warmblüterleber.

Während über die Atmung und Kohlehydratsynthese der Leber in einer späteren Arbeit genauer berichtet werden soll, teilen wir bereits hier eine Reihe von Versuchen mit, die den Einfluß der in den vorigen Abschnitten untersuchten Stoffe auf die Atmung der Leber behandeln. Die Wirkung der Milchsäure und Brenztraubensäure auf die Leberzelle stimmt mit der auf den Muskel vollständig überein, und zwar ergibt sich wieder, daß Milchsäure eine geringere, Brenztraubensäure eine erhebliche Steigerung der Atmung der Leberzellen der Ratte herbeiführt. Auch hier finden wir eine geringe anaerobe und eine gesteigerte aerobe Bildung von Extrakohlensäure aus Brenztraubensäure, wobei der respiratorische Quotient unter Abzug der carboxylatisch gebildeten Kohlensäure gleich 1,3 ist. Es entspricht dies wiederum einer Kohlehydratsynthese. In der Tat sprechen einige vorläufige Kohlehydratbestimmungen in der Leber dafür, daß der Kohlehydratgehalt unter dem Einfluß von Milchsäure und Brenztraubensäure in Gegenwart von Sauerstoff zunimmt. Während wir ebenso wie *Warburg* und *Minami*[1]) für die Leberzellen ernährter Ratten durchschnittlich ein Q_{O_2} von etwa 10 finden (10 ccm Sauerstoff pro Gramm Trockengewicht und Stunde), ist dieser Wert bei Ratten, die bereits 2 oder 3 Tage vor dem Versuch gehungert haben, häufig kleiner. In diesem Falle wirkt schon Traubenzucker meist steigernd und ergibt für die Zeit von 2 bis 3 Stunden einen mittleren Q-Wert von 9,4 (statt 7,8 ohne Zusatz). Für Milchsäure erhält man im Durchschnitt 12,3, für Brenztraubensäure 14,9. Dabei ist die Atmungsgröße von der Konzentration der Brenztraubensäure wenig abhängig: Für drei verschiedene Konzentrationen: 0,018 n, 0,036 n und 0,072 n ergaben sich in einem Versuch Q_{O_2}-Werte von 16,3, 14,9, 14,9, während der Wert ohne Zusatz 9,0 betrug. Es ist in der Tabelle XIV zunächst ein Vergleich der Q_{O_2}-Werte für Traubenzucker, Milchsäure und Brenztraubensäure wiedergegeben, wobei zur Hauptsache Ratten, die 2 bis 3 Tage gehungert hatten (in der Tabelle mit „h" bezeichnet), verwandt wurden. Die Leber derselben enthält, wie Stichproben zeigten, etwa 1 bis 2 Proz. Glykogen. Die Konzentrationen der zugesetzten Stoffe betrugen n/50 bis n/100. Die Leberschnitte von 0,2 bis 0,4 mm Dicke wurden in der gleichen

[1]) *Warburg* und *Minami*, diese Zeitschr. 142, 334, 1923.

Ringer-Phosphatlösung suspendiert wie das Zwerchfell. Die p_H, die etwa 7,5 betrug, änderte sich während des Versuchs nicht merklich. Später stellte sich heraus, daß die Atmung der Leberzellen in Serum beträchtlich größer als in gepufferter Ringerlösung ist, und zwar durch einen Einfluß des Serumeiweißes. Doch wurde in der vorliegenden Arbeit von dieser Feststellung noch kein Gebrauch gemacht.

Tabelle XIV.
Atmungssteigerung der Leberzellen durch Traubenzucker, Milchsäure und Brenztraubensäure.

Nr.	Datum 1924/25	Ernährungszustand (f = gefüttert, h = hungernd)	Zeitdauer	Q_{O_2} ohne Zusatz	Q_{O_2} mit Traubenzucker	Q_{O_2} mit Milchsäure	Q_{O_2} mit Brenztraubensäure
1	6. XII.	f	1h	9,2	—	—	14,4
2	2. II.	f	1 30′	10,0	—	11,4	11,5
3	4. II.	h	3	5,9	—	—	11,1
4	6. II.	h	3	10,4	11,9	—	—
5	7. II.	h	3	—	7,1	12,2	17,3
6	9. II.	h	2	9,0	11,25	—	16,3
							14,9
							14,9
7	9. II.	h	2	5,6	7,2	12,5	—
8	19. II.	h	2	9,1	—	—	14,6
9	17. II.	h	2	8,95	9,3	—	—
	Durchschnitt bei hungernden Ratten			7,8	9,4	12,3	14,9

Mit der Froschleber war die carboxylatische Spaltung der Brenztraubensäure ebenso wie die aerobe Bildung von Extrakohlensäure nicht deutlich. Dagegen ließ sich an den Leberschnitten der Ratten in gleicher Weise wie am Zwerchfell beides quantitativ verfolgen. Auch hier wurde zur Berechnung der Kohlensäurebildung das Gewicht des Gewebes auf das im Sauerstoffversuch benutzte Gewebestück umgerechnet und dieser Wert in der Tabelle angeführt.

Tabelle XV.
Bildung von Extrakohlensäure in der Leber bei Gegenwart von Brenztraubensäure.

Nr.	Datum 1924/25	Trockensubstanz mg	Versuchszeit	Atmosphäre	O_2 cmm	CO_2 cmm	Respiratorischer Quotient	Extrakohlensäure pro g Trockengewicht und Std. ccm	Q_{O_2}
1	6. XII.	8,55	3h	O_2	343	455	1,32	**4,4**	**13,3**
		3,67		N_2	—	6	—	**0,55**	—
2	11. I.	3,42	3	O_2	105	160	1,52	**5,35**	**10,3**
		3,88		N_2	—	21	—	**1,8**	—

Nun aber verhält sich die Atmung der Leberzellen in einem Punkte anders als die des Muskels. Außer Brenztraubensäure und Milchsäure rufen noch verschiedene andere der im vorigen Abschnitt geprüften Substanzen eine deutliche Steigerung der Atmung hervor. Es sind dies nach den bisherigen Feststellungen vor allem: Asparagin, etwas schwächer Alanin, Glycerinsäure und vielleicht auch Glutaminsäure und Tyrosin, während Glykokoll, Dioxyaceton, Glycerinaldehyd, Glycerin entweder nicht oder nur sehr schwach wirksam sind. Die Steigerung der Atmung durch Aminosäuren und Amide verdient wohl ein besonderes Interesse. Sie entspricht offenbar der sogenannten „spezifisch-dynamischen Wirkung“ des Eiweißes, die bereits *Graham Lusk*[1]) auf die Fähigkeit gewisser Aminosäuren, Zucker zu bilden, zurückzuführen suchte. Wenn nach der Desaminierung dieser Stoffe Zucker gebildet wird und dann die Aminosäuren erst nach Synthese zu Zucker verbrannt werden, so ist diese Atmungssteigerung nichts anderes als die durch Milchsäure oder Brenztraubensäure erzeugte, die mit der Kohlehydratsynthese dieser Säuren gekoppelt ist. In der Tat zeigt sich weiterhin, daß im Gegensatz zum Muskel die Leber eine starke Abspaltung von Ammoniak aus einzelnen Aminosäuren hervorruft. Während sich bei Asparagin kein deutlicher Unterschied zwischen Sauerstoff und Stickstoff ergab, ist die Spaltung bei Alanin in Sauerstoff doppelt bis dreimal so groß[2]). Die Spaltung selbst verläuft also schon zum Teil anaerob, aber der desaminierte Stoff ist dann atmungswirksam. Tatsächlich reicht die so entstandene Menge desselben aus, um den ganzen Mehrverbrauch an Sauerstoff zu bestreiten. Der Umstand, daß hier wiederum die Ammoniakabspaltung in Stickstoff nicht unterbleibt, aber durch Sauerstoff erheblich gesteigert wird, spricht dafür, daß ein ähnlicher Vorgang auch der spontanen Abspaltung des Ammoniaks zugrunde liegt, die wir oben am Zwerchfell beschrieben haben und die *Warburg*, *Negelein* und *Posener* vor allem bei den stark glykolysierenden Geweben, dem Carcinom und der Retina, gefunden haben, und die sich in dieser Beziehung ebenso verhält. In der Tabelle XVI ist zunächst die Atmungsgröße bei Zusatz verschiedener steigernder Substanzen angeführt und in der darauf folgenden einige Versuche über die Ammoniakabspaltung wiedergegeben.

Das Ammoniak wurde nur in der Lösung bestimmt, da angenommen werden konnte, daß es aus den dünnen Gewebsschnitten vollständig in die Lösung übertritt. In einigen Versuchen der Tabelle XVII wurde

---

[1]) *Graham Lusk*, Journ. of biol. Chem. **13**, 155, 1912; **20**, 555, 1915; *Csonka*, ebendaselbst **20**, 539, 1915.

[2]) Bereits *S. Lang*, Hofmeisters Beiträge **5**, 321, 1904 stellte fest, daß der Amid-N_2 von Asparagin und Glutamin besonders leicht durch verschiedene Gewebe abgespalten wird.

Tabelle XVI.
Atmungssteigerung durch glycerinsaures Na und Aminosäuren.

Nr.	Datum 1925	Ernährungszustand	Zeitdauer	Q_{O_2} ohne Zusatz	Q_{O_2} mit glycerinsaurem Na	Q_{O_2} mit Asparagin	Q_{O_2} mit Alanin	Q_{O_2} mit Glutaminsäure
1	4. II.	h	3h	5,9	—	—	13,3	—
2	6. II.	h	3	10,4	—	—	12,3	—
3	7. II.	h	3 30′	7,06	—	—	10,1	—
4	9. II.	h	2	5,6	—	—	11,1	—
5	12. II.	h	2	10,45	10,4	—	—	—
6	17. II.	h	2	8,95	—	15,6	—	11,4
7	18. II.	h	2	10,1	—	14,1	11,6	12,0
8	20. II.	h	2	8,7	12,6	10,85	—	8,8
9	21. II.	f	2	8,4	9,8	—	—	—
10	22. II.	h	2	9,05	13,0	—	—	10,3
		Durchschnitt:		8,47	11,45	13,5	11,9	10,6

zur Vervollständigung der Anaerobiose ebenso wie in Tabelle XIII außer Stickstoff auch Blausäurezusatz verwandt; da das Cyanid selbst eine geringe Menge Ammoniak enthielt, wurde sie in diesen Fällen in Abzug gebracht[1]).

Tabelle XVII.
Ammoniakabspaltung aus Amiden und Aminosäuren durch Lebergewebe.

Nr.	Datum 1925	Versuchszeit	Trockengewicht mg	Benutzter Zusatz	Konzentration des Zusatzes	Atmosphäre	NH_3 gebildet 10^{-6} g	NH_3 pro g und Stunde mg	Sauerstoff verbraucht cmm	Q_{O_2}
1	20. II.	2h	2,90	—	—	O_2	0,75	0,13	50,3	8,7
			4,06	Asparagin	0,02 n	O_2	16,5	2,06	88,0	10,85
2	21. II.	2	5,0	—	—	O_2	1,0	0,10	84	8,4
			4,44	Asparagin	0,02 n	N_2	9,1	1,02	—	—
3	21. II.	2	4,99	Asparagin	0,02 n	O_2	7,6	0,76	121	12,1
			3,63	Asparagin + KCN	0,02 n	N_2	9,3	1,28	—	—
			5,92	Alanin	0,02 n	O_2	4,5	0,36	132	11,15
			4,37	Alanin + KCN	0,02 n	N_2	1,4	0,16	—	—
4	23. II.	2	4,48	Alanin	0,02 n	O_2	3,0	0,33	95	10,6
			5,10	Alanin + KCN	0,02 n	N_2	1,42	0,14	—	—
5	25. II.	2	3,36	—	—	O_2	2,35	0,350	50,5	7,1
			4,08	Alanin	0,02 n	O_2	5,95	0,730	79,5	9,8
			4,69	Alanin	0,02 n	N_2	2,4	0,256	—	—
			4,64	Asparagin	0,02 n	O_2	12,5	1,35	98	10,5
			5,49	Asparagin	0,02 n	N_2	13,7	1,23	—	—

[1]) Weitere Versuche mit anderen Aminosäuren ergaben, daß von allen geprüften Alanin am meisten NH_3 abspaltet, Tyrosin, Phenylalanin ergeben wenig, Glykokoll, Leucin, Asparaginsäure keine deutliche Menge NH_3.

Bereits in der vorläufigen Mitteilung unserer Versuche wurde darauf hingewiesen, daß insbesondere die Synthese der Brenztraubensäure mit verschiedenen, am ganzen Warmblüterorganismus erhobenen Befunden in Zusammenhang steht. Vor allem haben *P. Mayer*[1]) sowie *Dakin* und *Janney*[2]) eine Zuckerbildung nach Brenztraubensäurezufuhr beobachtet; andererseits stellten *Rona* und *Neukirch*[3]) fest, daß Glucose in ihrer Wirkung auf Herz- und Darmmuskulatur durch Brenztraubensäure ersetzt werden konnte. Eine Assimilation der Aminosäuren auf diesem Wege kann jedoch, wie aus unseren Versuchen hervorgeht, der isolierte Muskel nicht vollbringen, sondern offenbar nur die Leberzelle. Ob die Synthese auf dem Wege über Milchsäure oder Brenztraubensäure erfolgt, muß vorläufig dahingestellt bleiben.

Wir danken Herrn *Walter Schulz* für seine Hilfe bei der Ausführung der Versuche.

Zusammenfassung.

1. Durchströmt man Froschschenkel von den Gefäßen aus mit milchsäurehaltiger, sauerstoffgesättigter Ringerlösung, so nimmt der Glykogengehalt der durchströmten Schenkel gegenüber den nicht oder mit reiner Ringerlösung durchströmten symmetrischen Schenkeln zu.

2. Der Mechanismus dieser Kohlehydratsynthese läßt sich durch Einlegen von Froschmuskeln in milchsäurehaltige Lösung und gleichzeitige Messung des Sauerstoffverbrauchs studieren: Die Atmung der Muskeln steigt in Lactatlösung um 50 bis 150 Proz., und gleichzeitig wird die Milchsäure zu Kohlehydrat synthetisiert. Das Verhältnis: $\frac{\text{gesamte Milchsäure verschwunden}}{\text{Milchsäureäquivalente oxydiert}}$, der „Oxydationsquotient" der Milchsäure, ist im Durchschnitt 4,33, genau wie bei der Erholung des Muskels. Der Erholungsmechanismus ist damit klargestellt: Die Erholung wird durch nichts anderes als durch das angehäufte Lactat veranlaßt. Andererseits sinkt die Atmung bei Zunahme der H-Ionenkonzentration.

3. Von allen sogenannten Zuckerbildnern des Organismus ist allein die Brenztraubensäure imstande, die Milchsäure zu ersetzen. In Brenztraubensäurelösung steigt die Atmung wie in Milchsäurelösung, und der Kohlehydratgehalt der Muskeln nimmt in demselben oder noch höherem Maße zu. Vergleicht man Kohlehydratsynthese und Extrasauerstoff, so läßt sich in Analogie zu den Milchsäureversuchen ein Oxydationsquotient von etwa 5 berechnen, ganz ähnlich wie im vorigen Falle. Bei der Synthese der Brenztraubensäure findet eine Reduktion statt;

---

[1]) *P. Mayer*, diese Zeitschr. **40**, 441, 1912; **49**, 486, 1913.
[2]) *Dakin* und *Janney*, Journ. of biol. Chem. **15**, 177, 1913.
[3]) *Rona* und *Neukirch*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **148**, 285, 1912.

entsprechend wird ein Überschuß an Kohlensäure gebildet. Überdies wird die Brenztraubensäure auch anaerob carboxylatisch gespalten. Der gemessene respiratorische Quotient, der titrierte Verlust an Brenztraubensäure, die carboxylatische Spaltung und die Kohlehydratsynthese geben eine annähernd übereinstimmende Bilanz der Brenztraubensäureumwandlung. Allerdings verschwindet auch etwas Brenztraubensäure durch unbekannte Nebenreaktionen.

4. Die Energetik der Synthese der Brenztraubensäure läßt sich auf Grund der Bestimmung der Umsatzwärmen der Brenztraubensäure behandeln. Die Verbrennungswärme, die von Dr. *Blaschko* bestimmt wurde, ergibt sich zu 3172,4 Cal pro 1 g, die Lösungs- und Verdünnungswärme zu 51,7 Cal. Es folgt daraus, daß pro Kubikzentimeter bei der Reduktion eingesparten Sauerstoffs 5,25 Cal absorbiert werden, während bei der Oxydation von Glykogen 5,07 Cal pro Kubikzentimeter Sauerstoff gebildet werden. Bei einem Extraverbrauch von Sauerstoff kann daher nahezu beliebig viel Brenztraubensäure synthetisiert werden, ohne daß die Wärmetönung der Reaktion erheblich herabgeht. Auch falls die Synthese über Acetaldehyd führt, gilt ähnliches. Die Verbrennungswärmen gelöster Brenztraubensäure und gelösten Acetaldehyds sind fast genau gleich; die carboxylatische Spaltung muß daher ohne Wärmetönung verlaufen.

5. Im Warmblütermuskel (Zwerchfell) sind dieselben Erscheinungen nachzuweisen. In Gegenwart von Milchsäure und Brenztraubensäure ist die Atmung für viele Stunden konstant und gegenüber der Norm gesteigert. Es ergibt sich in Ringer-Phosphatlösung für die Zeit von 4 bis 6 Stunden ein durchschnittlicher Q_{O_2}-Wert (Kubikzentimeter O_2 pro Gramm Trockengewicht und Stunde) von etwa 5 bis 6, in Gegenwart von Milchsäure von 7,5, von Brenztraubensäure von 9,7. Ebenso wird Extrakohlensäure aus Brenztraubensäure gebildet.

Bei der Atmung des ausgeschnittenen Zwerchfells in reiner Ringerphosphatlösung wird Ammoniak abgespalten und Harnstoff gebildet, was, als Eiweißverbrennung gedeutet, etwa 15 Proz. der Gesamtatmung entsprechen würde. Diese Ammoniakabspaltung wird ebenso wie durch Zusatz von Traubenzucker durch Zusatz von Brenztraubensäure und Milchsäure auf einen Bruchteil herabgedrückt. Ferner ist sie auch in Stickstoff erheblich herabgesetzt. Andererseits sind andere sogenannte Zuckerbildner ganz oder nahezu wirkungslos, ebenso wie sie keinen Einfluß auf die Atmung haben. Das gilt insbesondere auch für Aminosäuren.

6. Hinsichtlich der Wirkung der Milchsäure und Brenztraubensäure verhält sich die Warmblüterleber wie der ausgeschnittene Muskel. Bei der Leber von Hungerratten steigt der Q_{O_2}-Wert in Ringerlösung für eine Atmungszeit von 2 bis 3 Stunden, der ohne Zusatz 7,8 beträgt,

in Gegenwart von Zucker auf 9,4, von Milchsäure auf 12,3, von Brenztraubensäure auf 14,9. Andererseits wird die Atmung der Leberzellen auch durch andere Stoffe, insbesondere durch einzelne Aminosäuren erhöht, wobei eine Desaminierung stattfindet. Vor allem ist das Säureamid Asparagin und Alanin untersucht; die Ammoniakabspaltung ist mit Alanin dreimal, mit Asparagin zehnmal so hoch wie ohne Zusatz; die erstere wird ebenfalls durch Stickstoff stark herabgesetzt. Dies Verhalten erklärt vorzüglich die sogenannte „spezifisch-dynamische Wirkung" des Eiweißes, indem die desaminierten Aminosäuren in Gegenwart von Sauerstoff auf dem Wege über Milchsäure oder Brenztraubensäure zu Kohlehydrat synthetisiert werden.

Untersuchungen über extrahepatogene Gallenfarbstoffbildung an überlebenden Organen.

IV. Mitteilung:

Untersuchungen an der überlebenden Milz von mit Collargol und kolloidalem Eisen behandelten Hunden.

Von

Z. Ernst und J. Förster.

(Mitteilung aus der I. medizinischen Klinik der k. ungarischen Pázmány-Péter-Universität.)

(Eingegangen am 3. März 1925.)

Die Rolle des reticulo-endothelialen Apparats in der extrahepatogenen Gallenfarbstoffbildung wurde von *Mc Nee* und *Lepehne* erkannt. *Lepehne* wies in seinen grundlegenden Experimenten nach, daß die Funktionen der Zellen des reticulo-endothelialen Apparats nach Aufstapelung von fremden Stoffen aufhören. So verursacht bei Tauben nach Behandlung von Collargol eine AsH_3-Vergiftung keinen Ikterus, da die Gallenfarbstoffbildung der Kupferzellen in der Leber durch das darin aufgestapelte Collargol verhindert wird. Die von *Lepehne* gefundenen Resultate wurden auch von anderen bestätigt. Laut *Eppinger* bekommt ein mit kolloidalem Eisen intravenös behandelter Hund nach Toluylendiaminvergiftung keinen Ikterus. Ebenfalls aus *Eppingers* Experimenten geht hervor, daß mit Cholesterin gefütterte Kaninchen nach Toluylendiaminvergiftung nicht anämisch werden. *Marin* fand, daß nach Behandlung mit Collargol auf AsH_3-Vergiftung der Blutbilirubingehalt bei Tauben und Hunden nicht ansteigt, während er ohne Collargolbehandlung immer eine Steigerung aufweist. Neuestens hat *Elek* nachgewiesen, daß nach Sättigung des reticulo-endothelialen Apparats durch Kolloideisen die Bilirubinausscheidung eines Gallenfistelhundes beinahe gänzlich aufhört. Es sind aber auch in großer Zahl Experimente mit den entgegengesetzten Resultaten vorhanden, die da zeigen, daß die Sättigung der reticulo-endothelialen Zellen durch Kolloidstoffe nicht immer einen Einfluß auf die Gallenfarbstoffbildung hat. So fand auch *Lepehne* selbst, daß beim Kaninchen trotz Splenektomie und reichlicher Collargolbehandlung die AsH_3-Vergiftung Ikterus verursacht. *Rosenthal* und *Melchior* konnten aber trotz histologisch kontrollierter maximaler Sättigung des reticulo-endothelialen Apparats nicht finden, daß sich die durch Fäzes ausgeschiedene Menge des Gallenfarbstoffs verringert hätte. Nach *Bieling* und *Isaac* kann der nach Injizieren von Hämolysin auftretende Ikterus durch vorangehende Sättigung von Kolloideisen nicht verhindert werden; der Ikterus

stellt sich sogar nach Milzexstirpation und Sättigung der reticulo-endothelialen Zellen mit derselben Intensität ebenso schnell ein, wie beim normalen Tiere. *Rosenthal* und *Fischer* wiederholten die mit Toluylendiamin durchgeführten Experimente *Eppingers* und machten die Beobachtung, daß die Vergiftung mit Toluylendiamin beim Hunde trotz Sättigung durch Kolloideisen Ikterus verursacht. Diese letzteren Experimente weisen darauf hin, daß die Sättigung des reticulo-endothelialen Apparats mittels Kolloidstoffen auf die normale und pathologisch gesteigerte Gallenfarbstoffbildung keinen Einfluß hat. Daraus schließen *Rosenthal* und *Fischer*, *Rosenthal* und *Melchior*, *Bieling* und *Isaac*, daß entweder durch Sättigung die Funktion des reticulo-endothelialen Apparats nicht gehindert wird, d. h. es werden die Zellen in der Deutung nach *Lepehne* nicht „blockiert“ oder aber, vorausgesetzt, daß die „Blockierung“ zustande kam, spielt der reticulo-endotheliale Apparat bei der Gallenfarbstoffproduktion keine bedeutsame Rolle. Die Begriffe „Sättigen“ und „Blockieren“ wurden bisher als identisch betrachtet; der histologisch wahrgenommenen Sättigung der reticulo-endothelialen Zellen durch Kolloidkörnchen und der „Blockierung“ wurde dieselbe Bedeutung zugesprochen, und zwar das Ausbleiben der Funktionen. *Dies ist aber nicht richtig, denn die in die Zellen aufgenommenen Körnchen verhindern nicht notwendigerweise die Funktion der anderen Protoplasmateile.* Einige Funktionen werden natürlich verhindert, so ist es leicht verständlich, das z. B. die mit Silberkörnchen gänzlich ausgefüllte Zelle schon wegen Platzmangel keine roten Blutkörperchen phagocytieren kann, wie dies *Lepehne* bemerkte. Aber kleinere Körnchen können auch noch durch diese gesättigte Zelle aufgenommen werden, wie durch die von *Rosenthal, Moses* und *Petzal*, ferner *Petroff* mit mehreren Stoffen nacheinander ausgeführten Sättigungsversuche bewiesen wurde. Die Ausfüllung der Zelle durch einen Fremdstoff wirkt auf die chemischen Funktionen nicht notwendigerweise lähmend. Hier können vielleicht auch die chemischen Eigenschaften des die Zellen ausfüllenden Fremdstoffs eine Rolle spielen, worauf schon *Rosenthal* und *Melchior* aufmerksam machten. Es ist leicht, sich vorzustellen, daß von den zum Sättigen benutzten Stoffen der eine infolge seiner chemischen Eigenschaften irgendwelche Funktion der reticulo-endothelialen Zellen hemmt, während ein anderer, chemisch mehr indifferenter Stoff keine derartige Wirkung ausübt. Es ist sogar möglich, daß diese chemische Wirkung bloß bei der einen Tiergattung zur Geltung kommt, bei einer anderen nicht. Vielleicht ist dies die Erklärung der vielen Widersprüche, die sich bei den sogenannten „Blockierversuchen“ ergeben. Wir finden kaum zwei solche Versuche, in denen bei der gleichen Tiergattung ein und derselbe Kolloidstoff und ein und dasselbe ikterogene Gift verwendet wurde. Und wo all diese Voraussetzungen übereinstimmen, wie bei *Eppinger* sowie in den Experimenten von *Rosenthal* und *Fischer*, dort liegt die Ursache des Widerspruchs in den verschiedenen Beobachtungsmethoden. Beide prüften die Wirkung von Toluylendiamin bei normalen und vorher mit Eisen behandelten Hunden, doch während *Eppinger* die durch Gallenfistel entleerte Menge von Gallenfarbstoff feststellte, untersuchten *Rosenthal* und *Fischer* den Blutbilirubingehalt. Nach *Eppinger* steigt die Gallenfarbstoffausscheidung beim normalen Hunde nach Toluylendiaminvergiftung beträchtlich an, bei den mit Eisen behandelten Hunden aber nicht. Daraus folgert *Eppinger*, daß zum Entstehen des Toluylendiaminikterus die Funktion des reticulo-endothelialen Apparats notwendig ist. *Rosenthal* und *Fischer* beobachteten den Blut-

bilirubingehalt und fanden zwischen dem Toluylendiaminikterus normaler und vorher mit Eisen behandelter Hunde keinen Unterschied. Dies spricht ihrer Meinung nach gegen die ikterogene Funktion des reticulo-endothelialen Apparats. Die vorher erwähnten Experimente von *Elek* klären einigermaßen diese widersprechenden Resultate auf. Er untersucht in diesen Experimenten die Wirkung der Eisenbehandlung auf die Gallenfarbstoffausscheidung und auf den Bilirubingehalt eines Gallenfistelhundes. Nach seinen Beobachtungen verringert sich nach der Eisenbehandlung die Ausscheidung des Gallenfarbstoffs auf kurze Zeit, oder sie hörte sogar vollkommen auf. Zu gleicher Zeit erscheint dennoch im Blut und Urin entweder gar kein Bilirubin oder nur in minimaler Menge. Laut *Elek* schließt dies die Gallenfarbstoffretention als Ursache der verminderten Ausscheidung aus; seiner Meinung nach sprechen seine Experimente für die Auffassung *Aschoffs*, laut welcher die Gallenfarbstoffproduktion im reticulo-endothelialen Apparat vor sich geht. Nach gründlicher Durchsicht der Versuche von *Elek* können wir seine Folgerungen nicht annehmen. Er führte insgesamt vier Versuche aus: Unter diesen (im Falle Nr. 2) fällt die Bilirubinausscheidung schon vor Beginn der Behandlung von einem Tage auf den anderen von 450 auf 54, am nächsten Tage auf 39 und steigt in den ersten Tagen der Eisenbehandlung von neuem auf 160, dann auf 306. Während der weiteren Behandlung verändert sich die Bilirubinausscheidung ebenso unregelmäßig, fällt aber nicht unter den vor Beginn des Versuchs konstatierten Wert. Die Eisenbehandlung änderte also in diesem Falle an der Ausscheidung des Gallenfarbstoffs nichts. Bei einem zweiten Versuch scheint sich die Gallenfarbstoffausscheidung unter der Wirkung der Behandlung zu verringern, die Beobachtung dauerte aber eine zu kurze Zeit, und darum ist auch dieser Versuch vorsichtig zu werten. In zwei folgenden Experimenten verringerte sich die Gallenfarbstoffausscheidung während der Beobachtung wirklich in hohem Maße, dabei steigt aber der Blutbilirubingehalt bedeutend. So steigt im Experiment 3 der Blutbilirubinwert auf 2,2[1]), im Experiment 4 auf 4, und verbleibt während der ganzen weiteren Zeit der Beobachtung auf diesem hohen Werte. Dies ist keine minimale Quantität — wie es *Elek* nennt —, sondern eine ausgeprägte Erhöhung. Es ist eigentümlich und auf Grund unserer bisherigen Kenntnisse schwer zu verstehen, daß im Experiment 3 trotz des hohen Bilirubingehalts im Urin verhältnismäßig wenig Bilirubin vorhanden war. Es ist bekannt, daß das Hundeblut normal kein Bilirubin enthält, da der Schwellenwert der Bilirubinausscheidung bei dem Hunde sehr niedrig ist. Im Harn des Hundes erscheint Bilirubin schon bei so niedrigem Bilirubinwerte des Blutes, daß er auch mit der empfindlichsten Diazoreaktion kaum nachweisbar ist. Wenn aber das Blutbilirubin einen Wert von 0,5 bis 1,0 mg erreicht, ist im Harn sehr viel Bilirubin nachweisbar. Dies beobachteten wir in früheren Versuchen auch bei mit Phenylhydrazin vergifteten Hunden, wo bei einem Blutbilirubinwert von 0,6 bis 0,9 mg der Urin wegen seines großen Bilirubingehalts dunkelbraun gefärbt war. Im Versuch 4 von *Elek*, wo das Blutbilirubin noch höher steht als bei Experiment 3, ist eine Untersuchung des Urins auf Bilirubin nicht erwähnt. Nach dem Gesagten müssen wir es für sehr wahrscheinlich halten, daß der Harn auch bei diesen

[1]) Wahrscheinlich 2,2 mg. In der Tabelle ist nämlich nicht erwähnt, ob die Bilirubinwerte in Milligrammen oder in Bilirubineinheiten ausgedrückt sind.

Experimenten Bilirubin enthielt. Der Bilirubingehalt war nicht nur in diesen zwei Experimenten, sondern auch in den Experimenten 1 und 2 erhöht. Der erhöhte Bilirubinwert zeigt jedenfalls darauf hin, daß hier Gallenfarbstoffretention vorhanden war. Aus *Eleks* Experimenten geht also folgendes hervor: Nach Eisenbehandlung vermindert sich die Gallenfarbstoffausscheidung und zugleich steigt das Blutbilirubin entschieden an. Daraus folgt, daß nach Eisenbehandlung infolge eines bisher unbekannten Vorganges die Ausscheidung des Gallenfarbstoffs eine Störung erleidet und Gallenfarbstoffretention eintritt; demnach wird der Widerspruch zwischen *Eppinger* sowie *Rosenthal* und *Fischer* vielleicht verständlich. *Eppinger* sieht bei mit Eisen behandelten Hunden nach Toluylendiaminvergiftung keine Steigerung der Gallenfarbstoffausscheidung; dies liegt daran, daß, wie es *Elek* nachwies, sich die Gallenfarbstoffausscheidung nach Eisenbehandlung vermindert. *Rosenthal* und *Fischer* finden bei Toluylenvergiftung mit Eisen vorbehandelten Hunden keinen niedrigeren Bilirubinwert, als bei Hunden, die nicht mit Eisen behandelt wurden. Die Ursache hiervon ist — wie aus *Eleks* Beobachtungen hervorgeht —, daß auch die Eisenbehandlung selbst den Bilirubinwert erhöht.

Aus dem Besprochenen geht klar hervor, daß die Frage der „Blockierung“ des reticulo-endothelialen Apparats viel schwerer zu beurteilen ist, wie es nach den ersten Versuchen von *Lepehne* und *Eppinger* erscheint. Die Experimente von *Elek* wiesen darauf hin, daß die Sättigung mittels Eisens auch auf die Gallenfarbstoffausscheidung Einfluß haben kann, also auf einen solchen Faktor, welcher bei den bisherigen „Blockierungsversuchen“ außer acht gelassen wurde. Es ist auch wahrscheinlich, daß nicht nur die streng genommen zum reticulo-endothelialen Apparat gehörenden Zellen Bilirubin erzeugen, sondern vielleicht auch noch andere Zellen. Darauf deutet auch die im Subarachnoidealraum und im subkutanen Bindegewebe nach Blutungen eintretende Bilirubinbildung hin (*Leschke, H. v. d. Bergh, Johan*), im Organismus stehen wir also viel komplizierteren Verhältnissen gegenüber und müssen mit dem Zusammenspiel viel zu vieler Faktoren rechnen, als daß all diese Experimente einheitlich und deutlich erklärbar wären.

Wir wollten zur Klärung dieser Frage einigermaßen beitragen und untersuchten deswegen im Zusammenhang mit unseren früheren Versuchen an überlebenden Hundemilzen, welche Wirkung die Sättigung mit Kolloidstoffen auf die Bilirubinproduktion ausübt. Diese Methode schien zur Untersuchung der Frage geeignet, weil die Versuchsbedingungen viel einfacher sind als im Organismus, wo die Ausscheidung des Bilirubins und auch andere noch unbekannte Faktoren mitwirken. Bei der isolierten Milz haben wir nur mit wenig Zellarten zu rechnen, und die Bilirubinausscheidung, ferner andere noch unbekannte Faktoren üben auf das Endresultat des Versuchs keinen Einfluß aus. Wir behandelten Hunde mit Collargol und Eisen intravenös. Im vorgeschrittenen Stadium der Behandlung nahmen wir die Milz heraus und

durchströmten sie auf dieselbe Weise wie in unseren früheren Experimenten im *Brodie*schen Apparat. Die Kolloidbehandlung wurde so lange fortgesetzt, bis sich bei den Hunden die Zeichen des Unwohlseins bemerkbar machten. Das Unwohlsein äußerte sich in Mattigkeit, Appetitlosigkeit, dann Dyspnoe und in plötzlich auftretender Schwäche. Als wir die ersten Zeichen dieser Symptome wahrnahmen, trachteten wir, die Milzentnahme möglichst bald auszuführen. In zwei Fällen aber trat die Entkräftung der Tiere so plötzlich auf, daß der eine Hund wenige Stunden vor der geplanten Milzentnahme, der andere aber unmittelbar davor verendete; der Durchströmungsversuch wurde natürlich nicht ausgeführt. — Die Durchströmung geschah mit defibriniertem Blute, von dem wir einen kleinen Teil (6 bis 8 ccm), ebenso wie in unseren früheren Versuchen, auch hier vorher mit destilliertem Wasser hämolysiert hatten. Wir führten im ganzen drei Experimente aus, und zwar waren zwei Hunde mit Collargol und einer mit Ferrum oxydatum saccharatum vorbehandelt. Zur Behandlung benutzten wir 2,5proz. Collargol und eine 50 gew.-proz. Ferrum oxydatum saccharatumlösung, welch letztere beiläufig 1,5 bis 2 Proz. Eisen enthielt. Die die Versuche betreffenden Daten haben wir in der folgenden Tabelle zusammengestellt.

Nr.	Behandlung mit Collargol bzw. mit koll. Eisen	Tag des Versuches	Körpergewicht kg	Asphyxiezeit Min.	Blutmenge ccm	Gewicht der Milz g	Durchströmung pro Min. ccm	Versuchsdauer Std.	Bilirubin in 100 ccm vor dem Versuch	Bilirubin in 100 ccm nach d. Versuch mg
1	1924 25. III. 5,5 ccm 26. III. 5,5 „ 27. III. 5,5 „ 28. III. — 29. III. 10,0 „ zus. 26,5 ccm 2,5 proz. Collargol	29. III.	12,0	10	150	60	8—10	4	Spuren	2,2
2	26. IV. 19 ccm 27. IV. 15 „ 28. IV. 19 „ 29. IV. 13 „ 30. IV. 10 „ 1. V. — 2. V. 10 „ zus. 81 ccm 2,5 proz. Collargol	3. V.	11,0	3	130	54	10—14	4	Spuren	0,62
3	5. V. 10 ccm 6. V. 20 „ 7. V. 20 „ 8. V. 20 „ 9. V. 20 „ 10. V. 15 „ 11. V. 14 „ 12. V. 40 „ 13. V. 54 „ zus. 214 ccm Ferrum oxydatum saccharatum	14. V.	14,5	10	150	77	10—14	4	Spuren	2,1

Zu den einzelnen Versuchen müssen wir noch folgendes bemerken: Bei dem Versuch 1 sind beim Schluß des Versuchs im Fettgewebe viele punktförmige und ausgebreitete Blutungen zu sehen; an den von Blutungen freien Stellen ist das Fettgewebe von gelber Farbe, und darin ist auch chemisch Bilirubin nachweisbar. Bei Versuch 2 ist das Fettgewebe nicht gelb und chemisch bilirubinfrei. Am Ende der Untersuchung haben wir auch den Silbergehalt der Milz festgestellt. Sie enthielt 130 mg Silber, also beiläufig den neunten Teil der verabreichten Menge (1620 mg). Im Versuch 3 war das Fettgewebe trotz ausgeprägter Bilirubinproduktion am Ende der Untersuchung nicht gelb.

Wir müssen noch erwähnen, daß am Ende der Durchströmung das Blut in keinem Versuch so stark hämolysiert war wie in unseren früheren normalen und Phenylhydrazinversuchen. Das Volumen der Blutkörperchen machte beiläufig die Hälfte des Blutes aus, während es in unseren früheren Versuchen nur ein vierter bis achter Teil war. Ferner enthielt das Blutserum in unseren gegenwärtigen Versuchen nur so viel oder kaum etwas mehr Hämoglobin, als dem von uns hämolysierten Blute entsprach. Hingegen war in unseren Normalversuchen, wenn auch nicht immer, so doch sehr oft das Blutserum am Ende des Versuchs von dem vielen aufgelösten Hämoglobin beinahe undurchsichtig. Diese hochgradige Hämolyse schrieben wir früher der hämolysierenden Wirkung des Apparates zu. Aber eben die hier erwähnten Erfahrungen machten uns darauf aufmerksam, daß bei der Hämolyse vielleicht auch die Milz irgend eine Rolle spielt. Leider haben wir den Grad der Hämolyse und das Blutkörperchenvolumen weder in den früheren, noch in den jetzigen Versuchen bestimmt, und darum wagen wir nicht, die Hämolyse auf die eventuelle hämolysierende Wirkung der Milz zu beziehen, sondern wollen die Frage in weiteren Versuchen untersuchen.

Die Milz war in allen drei Fällen mäßig vergrößert und ihre Farbe, von der normalen etwas abweichend, eher etwas gräulich. Die histologische Untersuchung — die von Dr. *Stephan Sümegi* ausgeführt wurde — zeigte in allen drei Fällen im großen und ganzen dasselbe: die Pulpa war außerordentlich blutreich, die Gefäße mit roten Blutkörperchen strotzend gefüllt. Der größte Teil der Reticulumzellen ist vergrößert und voll von bräunlichgelben Pigmentkörnchen. Stellenweise sind weniger Pigment enthaltende Reticulumzellen, sehr spärlich sogar auch pigmentfreie Zellen zu sehen. Außer den phagocytierten Körnchen sind solche auch frei zwischen den Zellen zu sehen. Die *Malphigi*schen Follikel enthalten kein Pigment. Stellenweise sind in den Kapillaren mit Pigmentkörnchen gefüllte, abgestoßene Zellkonglomerate zu sehen. Nach der histologischen Untersuchung ist also die Milz mit Collargol oder Eisen vollständig gesättigt. Die hoch-

gradige Hyperämie war von der Durchströmung verursacht, die Milz schwillt nämlich hier ebenso wie in unseren früheren Untersuchungen während der Durchströmung augenscheinlich an.

Auffallend ist es, daß wir in allen drei Fällen im Blute Bilirubinspuren gefunden haben (in 100 ccm unter 0,2 mg), während das Blut normaler Hunde niemals Bilirubin enthält. *Elek* fand in seinen vorher erwähnten Versuchen ebenfalls Bilirubin im Blute der eisenbehandelten Hunde, sogar in viel größerer Quantität als wir. Infolge der Sättigung durch Kolloidstoffe erscheint also im Blute der Hunde auch laut unserer Versuche Bilirubin. Die Erklärung dieser Erscheinungen versuchten wir schon oben, als wir die Experimente von *Elek* besprochen haben. Leider haben wir versäumt, den Harn unserer Hunde auf eventuellen Gallenfarbstoffgehalt zu prüfen, da wir am Anfang dem Bilirubingehalt des Blutes keine Aufmerksamkeit schenkten.

Während der Durchströmung hat sich der Bilirubingehalt des Blutes in einem Falle in geringerem Maße, in den anderen zwei Fällen ausgeprägt *vermehrt*. Die zwei Collargolversuche vergleichend, sehen wir, daß im zweiten Versuch, wo wir mehr Collargol injizierten als im ersten, die Bilirubinproduktion kleiner ist als im ersten. Wenn wir als Maß der Sättigung die injizierte Collargolmenge annehmen, und wenn man aus nur zwei Versuchen einen Schluß ziehen dürfte, müßten wir aus dem Vergleich der zwei Versuche dahin schließen, daß die Sättigung die Bilirubinproduktion vermindert. Das histologische Bild aber zeigte in beiden Fällen eine gleich starke Sättigung, und deswegen konnte die Differenz in der Größe der Bilirubinproduktion nicht durch einen verschiedenen Sättigungsgrad bedingt werden. Die Größe der Bilirubinproduktion war übrigens in unseren früheren Normalversuchen auch ziemlich ungleich; daher dürfen wir annehmen, daß vielleicht verschiedene individuelle Eigenschaften der Versuchstiere den Unterschied zwischen Versuch 1 und 2 verursacht hätten. Der Mittelwert des in den drei Versuchen produzierten Bilirubins entspricht dem Durchschnittswert der Bilirubinproduktion einer normalen überlebenden Milz. Unsere Versuche beweisen also, daß die *vorhergehende Sättigung mit Kolloidsilber oder Eisen auf die Bilirubinproduktion der überlebenden Hundemilz keinen Einfluß hat.*

Das Ausbleiben der hemmenden Wirkung der Sättigung können wir auf verschiedene Art deuten. Die eine Erklärung wäre, daß das Bilirubin von jenen Zellen erzeugt wird, welche kein Kolloid aufstapeln. Solche kolloidfreie Zellen haben wir bei der histologischen Untersuchung hier und da beobachtet. *Pfeiffer* und *Standenath* wiesen darauf hin, daß die reticulo-endothelialen Zellen nicht gleichmäßig Kolloide in sich aufnehmen. Laut ihren Untersuchungen lagern sich Eisen-

körnchen je nach der Qualität der verwendeten Lösung einmal mehr in dem einen, ein anderes Mal in dem anderen Organ ab, sogar auch in ein und demselben Organ in verschiedenen Zellengruppen. Von diesem Gesichtspunkt aus betrachtet, ist die Dispersität der Lösung von besonderer Wichtigkeit. Zellen, die das Kolloid nicht aufspeichern, sind aber in unseren Versuchen von so geringer Zahl, daß es schwer fällt, die Bilirubinproduktion gänzlich diesen Zellen zuzuschreiben. Es ist auch nicht ausgeschlossen, daß an der Bilirubinproduktion nicht nur die Reticulum- und Endothelzellen, sondern auch die Pulpazellen einen Anteil haben. Jener Umstand nämlich, daß in den reticuloendothelialen Zellen phagocytierte rote Blutkörperchen und außerdem gelbes und grünes Pigment beobachtet wurde, ist noch nicht genügend zum Beweis dessen, daß die Umwandlung des Hämatins in Bilirubin nur hier geschieht. Nach der anderen und vielleicht wahrscheinlicheren Erklärung hemmt die Sättigung nicht die in den gesättigten Zellen verlaufende Bilirubinproduktion. Dieser Auffassung begegnen wir neuerlich in der Literatur immer öfter. Von besonderer Bedeutung sind in dieser Hinsicht die Untersuchungen von *Moellendorff*, der feststellte, daß die sich bei vitaler Färbung ablagernden Farbenkörnchen nicht in die lebenden Teile des Protoplasmas, sondern in den sich zwischen denselben befindlichen Saftkanälchen befinden. Letztere werden bei vitaler Färbung in Form von Körnchen sichtbar. Diese Teile des Protoplasmas sind für das Leben und für die Funktionen der Zelle nicht wichtig, und die darin sich ablagernden Körnchen verhindern nicht die Funktion der übrigen Zellteile. Die Untersuchungen von *Moellendorff* rechtfertigen also eigentlich jene Ansicht, daß die Sättigung nicht notwendigerweise „Blockierung" verursacht. Nach neueren Untersuchungen können die in den Zellen abgelagerten Körnchen die Zelltätigkeit auch lebhafter machen. So haben einige Forscher nach Kolloidsättigung die Steigerung bestimmter, den reticulo-endothelialen Zellen zugeschriebener Funktionen beobachtet. *Rosenthal* und *Fischer* sahen die Hämolysinproduktion bei Kaninchen nach Milzexstirpation und Sättigung durch Eisen nie sinken, sondern eher steigen. Laut *Pfeiffer* und *Standenaht* erhält das seiner Milz beraubte Kaninchen, das in diesem Zustande Präcipitin kaum produziert, durch Tuschbehandlung seine präcipitinerzeugende Fähigkeit im vollen Grade zurück. Aus dieser Tatsache schlossen *Pfeiffer* und *Standenaht* darauf, daß die Speicherung keine „Blockade" verursacht, sondern vielmehr als funktioneller Reiz wirkt. Zu ähnlicher Folgerung gelangt *Rösler*, der nach Tuschinjektion auf Grund der Blutuntersuchung eine Knochenmarkreizung feststellte. Die Sättigung verursacht also nicht notwendigerweise einen Ausfall der Funktionen, sondern sie kann manchmal auch zur Steigerung derselben führen.

Die Sättigung wirkt also nicht immer gleichartig auf die gesättigten Zellen. *Aschoff* hält es auch für möglich, daß die Sättigung die eine Funktion der Zellen lähmt und die andere gleichzeitig steigert. In unseren Versuchen erwies sich die Sättigung als vom Standpunkt der Bilirubinproduktion vollkommen indifferent. Natürlich dürfen wir nicht verallgemeinern. Es ist möglich, daß bei anderen Tierarten unter anderen Versuchsbedingungen die Sättigung die Bilirubinproduktion hemmt oder vielleicht steigert.

Obige Betrachtungen sind bei der Beurteilung solcher Versuche von Wichtigkeit, welche die Frage der extrahepatogenen Bilirubinbildung durch die Methode der Kolloidsättigung zu entscheiden bestrebt sind. Mit Rücksicht darauf, daß wir heute noch nicht wissen, welche Wirkung die Sättigung auf die Bilirubinproduktion ausübt, können wir die Methode der Sättigung nicht zur Untersuchung der Frage, ob es extrahepatogene Bilirubinproduktion gebe oder nicht, für geeignet halten.

Zusammenfassung.

Die Milz eines mit Kolloidsilber oder Eisen intravenös vorbehandelten Hundes produziert in demselben Maße Bilirubin wie die Milz eines normalen Hundes.

Die Versuche mittels „Blockade" sind zur Entscheidung der Frage der extrahepatogenen Bilirubinbildung nicht geeignet.

Literatur.

Aschoff, Klin. Wochenschr. 1924, Heft 22, S. 962. — *Berg*, Der Gallenfarbstoff im Blute 1918. — *Bieling* und *Isaac*, Klin. Wochenschr. 1922, Nr. 29; Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. Nr. 35. — *Elek*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 4, S. 143. — *Ernst* und *Szappanyos*, ebendaselbst 1922, Nr. 13; diese Zeitschr. **157**, 16, 1925. — *Johan*, Orvosképzés **12**, 17, 1922. — *Lepehne*, Zieglers Beitr. **24**, 1917; **65**, 1918; Münch. med. Wochenschr. 1919, Nr. 62, S. 23; Deutsch. Arch. f. klin. Med. **135**, 1921. — *Leschke*, Deutsch. med. Wochenschr. 1921, Nr. 14. — *McNee*, Med. Klin. 1913, Nr. 28. — *Moellendorff*, Münch. med. Wochenschr. 1920, Nr. 49; Ergebn. d. Physiol. 18, 1920. — *Marin*, Minerva Med. 1922, S. 572; zitiert Berl. klin. Wochenschrift 1924, S. 638. — *Petroff*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **35**, 1923. — *Rosenthal* und *Fischer*, Klin. Wochenschr. **46**, 1922. — *Rosenthal* und *Melchior*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **94**, 1922. — *Rosenthal, Moses* und *Petzal*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 12. — *Rösler*, ebendaselbst Nr. 9, S. 401. — *Weiss* und *Kunze*, Orvosi Arch. 4, 1924.

Autorenverzeichnis.

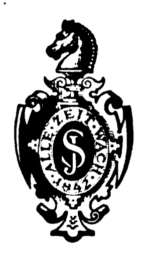
Biochemische Zeitschrift

Unter Mitwirkung von

herausgegeben von

C. Neuberg-Berlin

Hundertachtundfünfzigster Band



Berlin
Verlag von Julius Springer
1925

Druck von Friedr. Vieweg & Sohn Akt.-Ges., Braunschweig.

Inhalt.

Arthur Heffter †.

Am 8. Februar d. J. verschied *Arthur Heffter*. Am 15. Juni 1859 in Leipzig geboren, studierte er in seiner Vaterstadt sowie in Greifswald und Freiburg anfangs Chemie und später Medizin, um sich dann der Pharmakologie zuzuwenden. Er pflegte in erster Linie die chemische Richtung seiner Wissenschaft, und er hat mit einer großen Zahl wertvoller Arbeiten die Biochemie bereichert.

Heffters Untersuchungen über die Entstehungsweise des Schwefelwasserstoffs im Tierkörper, über dessen Resorption sowie Oxydation zu Thioschwefelsäure, seine Beobachtungen über die Bedeutung der Sulfhydrylgruppe, seine Arbeiten über die Chloralose (Glucose-Chloralverbindung), seine Methoden zur Darstellung von d-Glukonsäure, seine Studien über die verschiedenen Anhaloniumalkaloide sind allgemein bekannt. Seine Untersuchungen über das Verhalten der Borsäure im Organismus sind für die Nahrungsmittelchemie von großer Bedeutung geworden. Von seinen Arbeiten

analytischer Natur haben die von ihm angegebenen Verfahren zur Bestimmung des Jods in Geweben und Körperflüssigkeiten sowie zum Nachweise des in den Haaren abgelagerten Arsens weitgehende Verwendung gefunden.

Der Dahingeschiedene hat an der Universität Leipzig und nach vorübergehender Tätigkeit am Reichsgesundheitsamt an den Hochschulen Bern, Marburg und Berlin gewirkt; er hat sich des größten Ansehens bei seinen Kollegen und hoher Verehrung bei seinen Schülern und Mitarbeitern erfreut.

C. N.

Durch Lufteinblasen in das Euter milchgebender Tiere hervorgerufene Hyperglykämie.

Von

Erik M. P. Widmark und **Olof Carlens.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut, Lund.)

(Eingegangen am 24. Februar 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Wie bekannt, ist das Einblasen von Luft in das Euter ein fast unfehlbares Heilmittel gegen die Geburtsparese bei Kühen. Schon wenige Stunden nach dieser Behandlung erwachen die Tiere aus dem Koma und können sich bald wieder erheben. Nach dem Verlauf einiger weiterer Stunden sind sie vollkommen wieder hergestellt. Wir haben gefunden, daß diesem Einblasen von Luft in das Euter milchgebender Tiere unmittelbar eine kurz andauernde, aber kräftige Hyperglykämie folgt. Dieses Phänomen scheint uns in nahem Zusammenhang mit dem zu stehen, was frühere Forscher bei der operativen Entfernung der Milchdrüsen beobachtet haben.

So fand schon 1884 *Bert*[1]), daß bei einer Ziege, der die Milchdrüsen wegoperiert sind und die dann trächtig wird, unmittelbar nach der Niederkunft Glykosurie eintritt, während dies bei normalen Ziegen nicht der Fall ist. Die Richtigkeit dieses Versuchs wurde 1909 von *Porchet*[2]) konstatiert. Er zeigte, daß die Glykosurie bei Tieren, die ihrer Milchdrüsen beraubt waren, von einer Hyperglykämie begleitet wird. Ferner stellte er fest, daß das fragliche Kohlenhydrat Glucose und nicht Lactose war, und daß diese Hyperglykämie nur kurze Zeit andauerte. In unseren Versuchen können wir das Einblasen von Luft als Ersatz eines Wegoperierens der Milchdrüsen betrachten, indem das Lufteinblasen die Lactation für die nächste Zeit unmittelbar unterbricht.

---

[1]) C. r. de l'Acad. d. Sciences 98, 775, 1884.

[2]) Arch. intern. d. physiol. 8, 356, 1909. Hierher gehörige Untersuchungen sind außerdem von *Meigs* in Physiol. Rev. 2, 211, 1922 ausführlich referiert, weshalb wir hier von einer eingehenderen Historik Abstand nehmen.

Wir finden also zwischen den eben erwähnten operativen Versuchen und unseren unten geschilderten eine eingehende Analogie.

Versuchsprotokoll.

Der Reduktionswert des Blutes nach dem Lufteinblasen in das Euter milchgebender Kühe.

Die Analysen wurden mit der Mikromethode von *Bang* ausgeführt und sämtliche von dem einen von uns beiden vorgenommen (*Carlens*). Alle Werte sind Mittel von zwei Bestimmungen. Zu den beiden untenstehenden Versuchen wurden die Blutproben teils der Vena mammaria, teils der Vena jugularis entnommen. Bei den späteren Versuchen wurde das Blut stets einer Ohrvene entnommen.

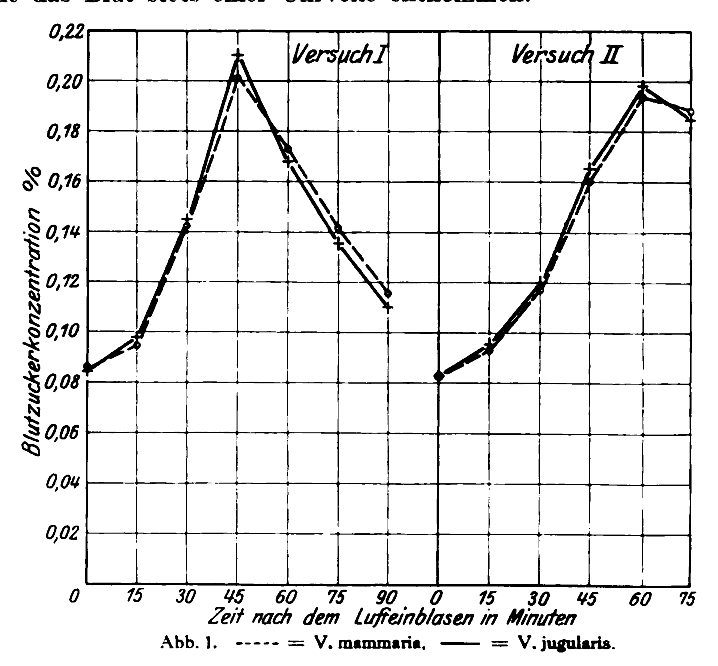


Abb. 1. ----- = V. mammaria. —— = V. jugularis.

Versuch 1.

27. Oktober 1923. Stark milchgebende Kuh. Kraftfutter.

Zeit	Blutzucker in Proz.	
	V. mammaria	V. jugularis
Vor dem Lufteinpumpen	0,085	0,086
Nach 15 Minuten	0,098	0,094
„ 30 „	0,145	0,142
„ 45 „	0,210	0,200
„ 60 „	0,168	0,172
„ 75 „	0,135	0,141
„ 90 „	0,110	0,115

Versuch 2.

4. November 1923. Gleicher Versuch wie der vorige, nur an einer anderen stark milchgebenden Kuh. Kraftfutter.

Zeit	Blutzucker in Proz.	
	V. mammaria	V. jugularis
Vor dem Lufteinpumpen	0,083	0,083
Nach 15 Minuten	0,095	0,093
„ 30 „	0,120	0,118
„ 45 „	0,165	0,160
„ 60 „	0,198	0,196
„ 75 „	0,185	0,188

Versuch 3.

3. November 1924. Ziege mit einer Tagesmilchmenge von etwa 2 kg.

Zeit	Blutzuckerkonzentration Proz.
Unmittelbar vor dem Lufteinblasen . . .	0,046
Unmittelbar danach	0,087
Nach 15 Minuten	0,089
„ 30 „	0,130
„ 45 „	0,060
„ 60 „	0,062
„ 75 „	0,062
„ 90 „	0,062

Der Reduktionswert des Harns nach dem Lufteinblasen in das Euter.

Versuch 4.

19. November 1924. Ziege mit etwa 1,5 kg Tagesmilchmenge. Kraftfutter.

Zeit	Blutzuckerkonzentration Proz.
Vor dem Lufteinblasen	0,092
Unmittelbar danach	0,095
Nach 15 Minuten	0,098
„ 30 „	0,123
„ 45 „	0,093

Der Harn wurde mit Katheter entnommen. Die Reduktionswerte desselben, in Prozenten Glucose berechnet, waren:

Vor dem Lufteinblasen	0,46
Die Portion während der Zeit 0 bis 20 Minuten . . .	1,03
,, ,, ,, ,, ,, 20 ,, 50 ,, . .	1,22

Versuch 5.

22. November 1924. Gleiches Tier wie zu Versuch 4. Tagesmilchmenge nur 350 ccm. Im Blut:

Zeit	Proz.
Vor dem Einblasen	0,060
Nach 15 Minuten	0,062
„ 30 „	0,082
„ 45 „	0,086
„ 60 „	0,068

Der Harn:

Reduktionswert, berechnet als Glucose vor dem Lufteinblasen 0,31 Proz.
Reduktionswert, während der Periode 0 bis 30 Minuten nach dem Lufteinblasen . . . . 0,42 „
Reduktionswert, während der Periode 30 bis 60 Minuten nach dem Lufteinblasen . . . . 0,56 „

Diese Harnproben wurden einer 24stündigen Gärung unterworfen, wobei gleichzeitig Kontrollproben mit Harn nach Zusatz von Glucose und Lactose vorgenommen wurden. Nach dem Gären wurden folgende Reduktionswerte erhalten:

Für die Portion vor dem Einblasen . . . . 0,25 Proz.
„ „ „ 0 bis 30 Minuten danach . . . . 0,27 „
„ „ „ 30 „ 60 „ „ . . . . . 0,25 „

Die Erhöhung der Reduktionswerte des Harns nach dem Einblasen von Luft muß in diesem Versuch also ganz und gar der Glucose zugeschrieben werden.

Versuch 6.

19. November 1924. Versuch mit Lufteinblasen in das Euter einer Kuh. Milchmenge etwa 4 kg. Im Blut:

Zeit	Reduktionswert in Proz. Glucose berechnet
Vor dem Lufteinblasen	0,065
18 Minuten danach	0,076
30 „ „	0,082
45 „ „	0,093
60 „ „	0,100
75 „ „	0,095
90 „ „	0,089
100 „ „	0,087

Der Harn:

Der Reduktionswert vor dem Lufteinblasen . . . 0,41 Proz.
Für die Portion 0 bis 45 Minuten danach . . . . . 1,65 „
„ „ „ 45 „ 75 „ „ . . . . . 3,35 „

Nach dem Vergären war die Reduktion in den drei verschiedenen Proben bzw. 0,22 0,98 und 2,00 Proz.

Bei diesem Versuch ist in den Harn ein Gemisch von Glucose und Lactose übergegangen. Das Osazon des letzteren konnte auch im Harn nachgewiesen werden. In diesem Falle haben wir also Grund zu der Annahme, daß die eingetretene Hyperglykämie nicht nur durch Glucose verursacht wird, sondern daß nach dem Lufteinblasen auch Lactose resorbiert wurde. Hierfür spricht auch der relativ hohe Blutzuckerwert noch 105 Minuten nach dem Einblasen von Luft.

Versuch 7.

25. November 1924. Kuh mit etwa 3,5 kg Tagesmilchmenge. Im Blut:

Zeit	Proz.
Vor dem Lufteinblasen	0,063
10 Minuten danach	0,069
25 „ „	0,077
40 „ „	0,080
60 „ „	0,093
75 „ „	0,096
100 „ „	0,102
125 „ „	0,083
140 „ „	0,074

Der Harn:

Der Reduktionswert vor dem Lufteinblasen . . . 0,64 Proz.
Für die Portion 0 bis 60 Minuten danach . . . . 0,94 „
„ „ „ 60 „ 105 „ „ . . . . 2,50 „
„ „ „ 105 „ 130 „ „ . . . . 2,30 „

Die Reduktion nach dem Vergären betrug in den vier Portionen 0,21, 0,23, 0,42 und 0,43 Proz.

In diesem Falle besteht der größte Teil des Kohlenhydrats im Harn aus Glucose, nur ein geringer Teil ist Lactose.

Versuch 8.

3. Dezember 1924. Kuh mit etwa 3 kg Tagesmilchmenge. Im Blut:

Zeit	Proz.
Vor dem Lufteinblasen	0,043
15 Minuten nachher	0,054
45 „ „	0,079
75 „ „	0,079
105 „ „	0,081
135 „ „	0,070

Der Harn:

Die Reduktion vor dem Einblasen . . . . 0,46 Proz.
Für die Portion 0 bis 75 Minuten nachher . . . . 1,15 „

Nach dem Vergären wurde in beiden Portionen erhalten: 0,26 und 0,24 Proz.

Bei diesem Versuch ist also durch das Lufteinblasen nur Glucose in den Harn übergegangen. Die Hyperglykämie wird nur durch Glucose veranlaßt.

Die Versuche ergeben, daß das Einblasen von Luft in das Euter regelmäßig von einer Hyperglykämie begleitet wird. Vergleicht man die höchsten Werte der Hyperglykämie bei den beiden ersten Versuchen mit den folgenden, so kann man konstatieren, daß das Lufteinblasen bei stark milchgebenden Tieren einen höheren Effekt hat als bei jenen. die geringere Milchquantitäten geben. Nach dem Lufteinblasen steigt der Blutzuckergehalt sehr rasch und erreicht sein Maximum gewöhnlich schon innerhalb 1 bis 1½ Stunden. Darauf nimmt er in der Regel sehr rasch wieder ab. Wie aus der Abbildung zu ersehen ist, folgen die Blutzuckerwerte der Vena mammaria sehr intim denen der Vena jugularis. Man kann vielleicht beobachten, daß die Werte in der Vena jugularis am aufsteigenden Aste der Kurve etwas niedriger sind als die in der Vena mammaria. Beim Abklingen der Hyperglykämie ist das Gegenteil der Fall. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Wertepaaren sind indessen so unbedeutend, daß man sie als innerhalb der Fehlergrenzen der Methodik liegend betrachten kann.

Dem Einblasen von Luft in das Euter folgt nicht nur eine Hyperglykämie. Es erfolgt auch ein Übergang von Kohlenhydrat in den Harn. Die Analysen ergeben, daß dieses Kohlenhydrat in gewissen Fällen nur aus Glykose bestehen dürfte. In anderen Fällen kann man auch einen Übergang von Lactose in den Harn bemerken. Diese Beobachtungen sprechen dafür, daß der Mechanismus der Hyperglykämie nicht nur durch eine Resorption von Lactose durch die Milchdrüsen erklärt werden kann. In gewissen Fällen entsteht die Hyperglykämie nur durch eine Erhöhung des Glucosegehalts des Blutes. In anderen Fällen (wenn das Euter vor dem Einblasen nicht vollständig ausgemolken wurde ?) nimmt auch Lactose an der Entstehung der Hyperglykämie teil.

Von Interesse ist es, festzustellen, daß gleichwie der Blutzuckergehalt bei diesen Tieren im allgemeinen erheblich niedriger als beim Menschen ist[1]), auch der Schwellenwert für die Glykosurie bedeutend niedriger liegt. Die hier veröffentlichten Messungen geben hinsichtlich der Maximalwerte der Hyperglykämie während der verschiedenen Versuche allerdings keine Antwort. Wir können uns denken, daß die höchsten Werte zwischen den Bestimmungen liegen. Doch dürften z. B. in den Versuchen 6 und 7 die höchsten Blutzuckerwerte 0,1 Proz. nicht wesentlich übersteigen. Schon bei dieser Konzentration gehen indessen bedeutende Mengen Glucose über. Im Versuch 8 finden wir

---

[1]) *Widmark* und *Carlens*, diese Zeitschr. 1925.

während der ersten 75 Minuten nach dem Lufteinblasen ungefähr 1 Proz. Glucose im Harn. Die höchste beobachtete Blutzuckerkonzentration betrug hier 0,081 Proz.

Da aus obenstehendem hervorgeht, daß die Hyperglykämie nicht ausschließlich und in gewissen Fällen überhaupt nicht durch eine Lactoseresorption erklärt werden kann, muß die Deutung der Entstehung derselben in anderen Ursachen gesucht werden.

Eine *nervöse Reizung*, die durch das Lufteinblasen in das Euter verursacht wird, kann a priori nicht ausgeschlossen werden. Nach dem Einblasen von Luft kann man nämlich oft kräftige Kontraktionen des Uterus beobachten. Man könnte sich also vorstellen, daß eine Reizung auf sympathischem Wege die Hyperglykämie herbeiführt.

Gegen das Vorhandensein einer psychischen Hyperglykämie spricht das Verhältnis, daß auch Tiere, die während der Geburtsparese vollkommen bewußtlos sind, nach dem Lufteinblasen eine ganz ähnliche Hyperglykämie wie gesunde Tiere zeigen. Das Einblasen von Luft scheint auch auf gesunde Tiere keine psychische Reizung auszuüben. Dies kann durchgeführt werden, während das Tier ruhig mit der Zusichnahme von Futter fortfährt. Wir haben auch keine durch den Einstich in die Ohrvene verursachte Erhöhung der Blutzuckerwerte beobachten können.

Obgleich das Vorhandensein einer Sympathicusreizung nicht ausgeschlossen werden kann, scheinen diese Versuche doch am einfachsten in Analogie mit den früher erwähnten Versuchen von *Bert* und *Porchet* erklärt werden zu können. Es dürfte ziemlich sicher sein, daß die Lactose aus jener Glucose gebildet wird, die die Milchdrüsen aus dem Blute aufnehmen. Bei einem stark milchgebenden Tiere muß diese Aufnahme von einer derartigen Größe sein, daß der gesamte Glucosegehalt des Blutes mehrmals pro Stunde in Anspruch genommen wird. Sobald das Lufteinblasen erfolgt und die Lactoseproduktion momentan abgebrochen wird, ist es natürlich, daß das Einströmen von Glucose in das Blut nicht gleichzeitig, dem herabgesetzten Bedarf entsprechend, vermindert wird. Hiermit sind die Bedingungen für die Entstehung einer Hyperglykämie gegeben. Sobald der Ausgleichsmechanismus durch das Auftreten der Hyperglykämie zu wirken begonnen hat, klingt die Hyperglykämie ab.

Die außerordentlich sichere Behandlungsweise, die man zur Bekämpfung der Geburtsparese im Einblasen von Luft erhalten hat, ist durch diese Versuche in ein neues Licht gestellt worden. Durch dieselbe wird nicht nur die in der Uterusgegend angesammelte Blutmasse verdrängt. Sie führt auch bestimmte chemische Veränderungen mit sich. Gerade in der Erhöhung des Glucosegehalts des Blutes sehen

wir die heilende Wirkung derselben, indem wir das Symptom der Geburtsparese als einen Ausdruck für eine Hypoglykämie betrachten, die durch die nach dem Kalben plötzlich einsetzende Lactation hervorgerufen wurde.

Zusammenfassung.

1. Das Einblasen von Luft in das Euter milchgebender Kühe und Ziegen verursacht eine kurz andauernde Hyperglykämie. Bei stark milchgebenden Tieren ist diese ausgeprägter als bei solchen, die geringe Quantitäten melken.

2. Die Hyperglykämie bringt einen Übergang von Kohlenhydrat in den Harn mit sich. In gewissen Fällen ist dieses vergärbar, in anderen Fällen konnte das Reduktionsvermögen des Harns durch Gärung nicht auf normale Werte herabgebracht werden. Hieraus wird geschlossen, daß die Hyperglykämie durch eine Erhöhung des Glucosegehalts des Blutes entsteht. Mitunter kommt indessen auch eine Resorption von Lactose seitens der Milchdrüsen vor.

3. Der Schwellenwert der Glykosurie liegt für Kühe bei 0.1 Proz. oder darunter, also bedeutend niedriger als beim Menschen.

4. Die günstige Wirkung des Lufteinblasens in das Euter bei Geburtsparese (Paralysis puerperalis) wird der Erhöhung des Glucosegehalts des Blutes zugeschrieben.

Untersuchungen über elektrische Erscheinungen und Ionendurchlässigkeit von Membranen.

I. Mitteilung:
Die Potentialdifferenz an der Apfelschale.

Von

Akiji Fujita.

(Aus dem biochemischen Institut der Aichi-medizinischen Universität zu Nagoya, Japan.)

(Eingegangen am 8. Januar 1925.)

Die physiologisch bedeutungsvolle Wirkung von Membranen infolge der an ihnen auftretenden elektrischen Potentialdifferenzen und elektiven Permeabilitätserscheinungen sind zweifellos nicht einheitlich zu erklären, weil es Membranen von sehr verschiedener Wirksamkeit gibt. Deshalb erscheint es günstig, eine Untersuchungsreihe über die Membranwirkung an einem Objekt zu beginnen, welches zwar ein wirkliches physiologisches Objekt ist und weit mehr als ein bloßes nachahmendes Modell darstellt, aber innerhalb der physiologischen Objekte sich durch besondere Einfachheit und Durchsichtigkeit der Verhältnisse auszeichnet. Dieses Objekt ist die von *Loeb* und *Beutner*[1]) zuerst untersuchte Fruchtschale, insbesondere die Apfelschale. Diese ist im Gegensatz zu den schwer sichtbaren Membranen der meisten, insbesondere der tierischen Zellen, ein mikroskopisch leicht erkennbares Objekt. Sie stellt einen homogenen, nicht aus Zellen bestehenden wachsartigen, mit Fettfarbstoffen färbbaren Überzug des Apfels dar, dessen Dicke etwa von derselben Größenordnung ist wie die einer größeren Pflanzenzelle, also ein leicht erkennbares Objekt, bei dem es

---

[1]) *J. Loeb* und *Beutner*, diese Zeitschr. **41**, 1, 1912; **44**, 303, 1912; **51**, 300, 1913.

nicht zweifelhaft sein kann, daß es einen lipoiden und keinen eiweißartigen Charakter hat. Andere Zellmembranen mögen eine andere Beschaffenheit haben, aber diese ist in der Regel so schwer erkennbar, daß heute immer noch verschiedene Theorien über die chemische Natur derselben existieren. Die Apfelschale ist im Gegensatz dazu ein leicht erkennbares Objekt. Sie ist eine Membran, bei welcher irgend eine der komplizierteren morphologischen Strukturen, wie z. B. ein mosaikartiger Bau aus lipoiden und albuminoiden Teilen nicht in Betracht kommen. In bezug auf die Entstehung der Potentialdifferenzen an den Membranen besteht eine Meinungsverschiedenheit. *Beutner* führt sie auf einen lipoiden Charakter ganz bestimmter Art zurück, welchen er durch einfache chemische Modelle nachahmen konnte. Während in neuerer Zeit unter *Höber* seine Schüler *Vorschütz*, *Natannsen*, *Matsuo*, *Mond*[1]) gezeigt haben, daß eiweißartige Membranen dieselbe Wirkung ausüben können und die physiologisch vorkommenden Membranwirkungen lieber durch die Annahme einer eiweißartigen Membran als einer lipoiden Membran erklären möchten, ist für die Apfelschale die lipoide Beschaffenheit der Membran ganz augenscheinlich. Eine genaue Aufklärung dieser Wirkung ist deshalb wünschenswert, selbst wenn andere Membranen der Physiologie von anderer Beschaffenheit sein sollten. Die Deutung dieser Potentialdifferenzen an der Apfelschale wurde bekanntlich von *Beutner* so gegeben, daß er sie als Phasengrenzpotential infolge verschiedener Verteilungen der Ionen zwischen der umgebenden Lösung und der Substanz der Membran auffaßt.

Diese erste Mitteilung hat zunächst den Zweck, die Befunde über die Potentialdifferenz an der Apfelschale genauer und umfangreicher nachzuprüfen, um sie als Grundlage benutzen zu können.

Unsere Versuchsanordnung war die folgende: Ein Apfel wurde in eine Petrischale gelegt, in welcher sich eine flache Schicht einer Elektrolytlösung befand. An der Oberseite des Apfels wurde ein kleines Loch bis in das Fruchtfleisch eingebohrt. In die mit n/10 KCl-Lösung ausgefüllte Bohrung des Apfels wurde je ein Glasheber getaucht, welcher mit einer mit KCl gesättigten 3proz. Agargallerte gefüllt war. Bei der Elektrolytlösung wurde diese Ableitung in gehöriger Entfernung von dem Apfel angebracht, so daß das allmählich herausdiffundierende KCl wenigstens in der Nähe der Apfelschale die Elektrolytlösung nicht verunreinigte. An der Bohrungsstelle des Apfels war eine solche Vor-

[1]) *Vorschütz*, Pflügers Arch. **189**, 181, 1921; **190**, 54, 1921; *Natannsen*, ebendaselbst **196**, 637, 1922; *Matsuo*, ebendaselbst **200**, 132, 1923; *Mond*, ebendaselbst **203**, 247, 1924; s. ferner die Zusammenfassung von *Höber*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **110**, 142, 1924.

sichtsmaßregel nicht erforderlich, weil hier eine bloße Flüssigkeitsverbindung zwischen dem Saft des Apfels und der KCl-Lösung vorliegt, an welcher keine Membranwirkung zur Geltung kommt. Hier kann höchstens ein Diffusionspotential übrig bleiben, welches für unsere Zwecke vernachlässigt werden kann und dadurch nicht merkbar beeinflußt wird, daß ein wenig KCl in den Apfelsaft hineindiffundiert. Die beiden Agarrohre wurden andererseits mit Hilfe eingeschalteter gesättigter KCl-Lösung je mit einer mit KCl gesättigten Kalomelelektrode verbunden. Der Potentialunterschied wurde anfänglich mit dem Binantelektrometer gemessen in der Weise, wie es in unserer Arbeit[1]) beschrieben ist. Später jedoch wendeten wir nur noch das gewöhnliche Kompensationsverfahren nach *Du Bois-Reymond* und *Poggendorff* an, da die Leitfähigkeit der Apfelschale für dieses viel bequemere Verfahren völlig hinreichend ist. Wir messen somit den Potentialunterschied des Apfelsaftes gegen die äußere Elektrolytlösung in der Petrischale. Die absoluten Werte dieser Potentialdifferenz hatten wenig Interesse, da sie von der Zusammensetzung des Apfelsaftes abhängen, welche schwer überblickbar ist. Wenn wir dagegen derartige Versuche an *einem* Apfel mit variierter Außenlösung machen, so zeigen diese Versuche die Abhängigkeit der Potentialdifferenz von der Zusammensetzung der Außenlösung an, während der Apfelsaft selbst eine stets konstante und daher belanglose Wirkung hat.

Die erste Versuchsreihe bezieht sich darauf, mit welcher Geschwindigkeit solche Potentialdifferenzen sich einstellen und in welchem Grade sie konstant und reproduzierbar sind. Tabelle I gibt für verschiedene Elektrolytlösungen darüber Auskunft. Wie man sieht, ist die erreichbare Konstanz einigermaßen gut. Bei manchen Elektrolyten wird ein einigermaßen konstanter Wert sehr schnell, bei anderen erst nach 10, 20, 30 Minuten erreicht und bleibt auf alle Fälle innerhalb einer Stunde, wo der Versuch abgebrochen wurde, fast konstant. Die Schwankungen um wenige Millivolt sind im allgemeinen kaum größer als bei den von uns früher untersuchten Phasengrenzketten mit Benzylalkohol[2]). Auffällig ist nur die starke Änderung bei Versuchen mit hohen Konzentrationen von Salzsäure (n/10). Das anfänglich sehr hohe Potential nimmt sehr schnell ab und erreicht schließlich angenähert den Wert 0. Dies gilt jedoch nur für die stärkeren HCl-Lösungen. In verdünnterer HCl-Lösung (n/100) stellt sich das Potential ebenso schnell wie in anderen Elektrolytlösungen ein. Besonders ist es hervorzuheben, daß bei KOH selbst in n/10 Konzentra-

[1]) *L. Michaelis* und *A. Fujita*, Zeitschr. f. physikal. Chem. **110**, 266, 1924.

[2]) *Dieselben*, l. c.

tion die Einstellung ziemlich schnell erfolgt. Die im allgemeinen sehr hohen absoluten Werte der Potentialdifferenzen, oft von 60 bis 80 Millivolt bei binären einwertigen Neutralsalzen, zeigen ganz deutlich, daß ein gewöhnliches Flüssigkeitspotential hier nicht in Frage kommt und eine Membranwirkung vorliegt.

Tabelle I.

Die verletzte Stelle stets mit 0,1 n KCl abgeleitet. Die unverletzte Stelle mit den folgenden Lösungen abgeleitet. Wo kein Vorzeichen angegeben, ist die unverletzte Stelle negativ. Die Konzentrationen sind in Äquivalenten, nicht in Molen angegeben.

n/10 KCl:

Sofort 62,5, nach 10 Minuten 58,0, nach 20 Minuten 52,3, nach 30 Minuten 48,5, nach 40 Minuten 46,0, nach 50 Minuten 45,0, nach 60 Minuten 44,8 Millivolt.

n/10 NaCl:

Sofort 60,3, nach 10 Minuten 62,8, nach 25 Minuten 60,2, nach 40 Minuten 58,7, nach 60 Minuten 53,3, nach 80 Minuten 50,4 Millivolt.

n/10 $CaCl_2$:

Sofort 59,4, nach 10 Minuten 62,5, nach 20 Minuten 61,2, nach 30 Minuten 58,7, nach 45 Minuten 55,3, nach 60 Minuten 54,3 Millivolt.

n/10 KOH:

Sofort 21,7, nach 10 Minuten 21,3, nach 20 Minuten 20,5, nach 30 Minuten 19,2, nach 40 Minuten 17,6, nach 50 Minuten 16,8, nach 70 Minuten 16,1 Millivolt.

n/10 HCl:

Sofort —52,7, nach 10 Minuten —12,6, nach 20 Minuten —7,2, nach 30 Minuten —5,8, nach 40 Minuten —2,0, nach 70 Minuten + 0,8, nach 80 Minuten 0 Millivolt (Wiederholungen dieses Versuchs mit dem gleichen Resultat.)

Anderer Apfel:

Sofort 21, nach 10 Minuten 8, nach 25 Minuten 6, nach 45 Minuten 6, nach 65 Minuten 5, nach 90 Minuten — 1, nach 102 Minuten 1, nach 112 Minuten 0, nach 132 Minuten 0 Millivolt.

n/100 HCl:

Sofort 23, nach 12 Minuten 29, nach 27 Minuten 29, nach 35 Minuten 28, nach 45 Minuten 24, nach 55 Minuten 25, nach 65 Minuten 26, nach 83 Minuten 21, nach 100 Minuten 23, nach 125 Minuten 22 Millivolt.

n/10 KBr:

Sofort 56,2, nach 10 Minuten 62,6, nach 20 Minuten 66,0, nach 30 Minuten 66,8, nach 40 Minuten 67,0, nach 50 Minuten 63,8, nach 60 Minuten 61,5 Millivolt.

n/10 KJ.

Sofort 46,4, nach 10 Minuten 48,3, nach 20 Minuten 47,5, nach 30 Minuten 46,5, nach 40 Minuten 44,4, nach 50 Minuten 44,2, nach 60 Minuten 41,1, nach 70 Minuten 39,6 Millivolt.

n/10 K_2CO_3:

Sofort 22,6, nach 10 Minuten 30,5, nach 20 Minuten 32,1, nach 30 Minuten 33,7, nach 40 Minuten 34,6, nach 50 Minuten 33,4, nach 60 Minuten 32,8, nach 70 Minuten 30,2 Millivolt.

n/10 KNO_3:

Sofort 76,1, nach 20 Minuten 74,5, nach 30 Minuten 70,4, nach 50 Minuten 62,6, nach 70 Minuten 54,3 Millivolt.

n/10 $MgCl_2$:

Sofort 80,9, nach 10 Minuten 84,6, nach 30 Minuten 81,9, nach 40 Minuten 80,2, nach 60 Minuten 77,5 Millivolt.

n/10 KSCN:

Sofort 41,0, nach 10 Minuten 41,3, nach 20 Minuten 44,3, nach 30 Minuten 40,0, nach 60 Minuten 39,5, nach 50 Minuten 38,0, nach 60 Minuten 36,4 Millivolt.

n/10 K_3-Citrat:

Sofort 25,0, nach 10 Minuten 29,4, nach 20 Minuten 30,3, nach 30 Minuten 29,3, nach 50 Minuten 25,7, nach 60 Minuten 25,7, nach 70 Minuten 27,3 Millivolt.

Die zweite Versuchsreihe soll zeigen, inwieweit die Resultate reproduzierbar sind, wenn man bei einem und demselben Apfel die Konzentration der Elektrolytlösung auf- und wieder absteigend variiert. Die Ablesungen wurden immer ziemlich bald nach dem Wechsel der Flüssigkeit notiert, also zu einer Zeit, wo die definitive Einstellung des Potentials vielleicht noch nicht ganz vollständig ist. In Anbetracht dieses Umstandes muß die Reproduzierbarkeit der Versuche, wenn man von einer konzentrierten Lösung über verdünntere und wieder zur konzentrierteren zurückgeht, als recht befriedigend bezeichnet werden.

Tabelle II.

		Apfel I	Apfel II			Apfel I	Apfel II
n/10	NaCl	43,2	39,0	n/10	$BaCl_2$	78,9	65,0
n/50		78,2	73,0	n/50		85,4	69,0
n/250		114,8	113,2	n/250		102,8	82,9
n/1250		148,5	140,0	n/1250		121,0	107,3
n/250		109,2	105,3	n/250		103,2	96,6
n/50		70,0	72,4	n/50		81,6	71,4
n/10		35,0	38,8	n/10		69,2	58,4

Tabelle II (Fortsetzung).

		Apfel I	Apfel II			Apfel I	Apfel II
n/10	LiCl	66,6	63,8	n/10	HCl	18,0	10,9
n/50		101,0	94,0	n/50		26,9	18,1
n/250		135,0	122,3	n/250		50,6	46,5
n/1250		161,3	150,2	n/1250		83,6	80,3
n/250		124,0	113,8	n/250		52,1	45,6
n/50		87,8	82,0	n/50		23,6	17,1
n/10		53,7	43,0	n/10		14,6	7,4
n/10	$MgCl_2$	95,4	93,2	n/10	KOH	36,4	29,4
n/50		103,0	101,0	n/50		71,0	63,5
n/250		118,8	119,5	n/250		110,6	100,9
n/1250		134,8	147,0	n/1250		148,0	141,0
n/250		116,8	123,0	n/250		109,0	101,1
n/50		99,2	96,0	n/50		66,6	63,4
n/10		82,8	74,7	n/10		27,6	26,5

Die nächste Versuchsreihe erstreckt sich auf Elektrolytlösungen, bei welchen das Kation variiert wurde, während als Anion stets Cl′ genommen wurde. Bei jedem einzelnen Elektrolyten wurde an *einem* Apfel eine Serie verschiedener Konzentrationen, absteigend und wieder aufsteigend untersucht. Die Kolumnen I bis IV bezeichnen Versuche mit vier verschiedenen Äpfeln. Wie man sieht, sind die absoluten Werte der Potentialdifferenz individuell oft sehr verschieden, dagegen sind die Differenzen beim Übergang von einer Konzentration zu einer anderen ziemlich gut reproduzierbar, wenn auch nicht immer in gleichem Maße. Bei den Versuchen mit einwertigen Kationen K, Na, Li, Rb, NH_4 erreichen diese Differenzen nicht selten ganz oder beinahe den theoretisch möglichen Maximalwert von etwa 40 Millivolt, wenn die Konzentrationen sich 1:5 verhalten. Für HCl gilt dasselbe, aber nur für niedere Konzentrationsbereiche. In höheren Konzentrationen ist der Unterschied bei einer Variation der Konzentration viel kleiner. Bei den zweiwertigen Kationen Ca, Mg, Ba erreichen die auf das gleiche Konzentrationsintervall bezogenen Unterschiede der Potentialdifferenz häufig den theoretischen Maximalwert von 20 Millivolt. Im allgemeinen zeigt sich hier eine Neigung, daß im Bereich höherer Konzentrationen dieser Potentialunterschied bei Variation der Konzentration kleiner ist als im Bereich niederer Konzentrationen, ähnlich, wenn auch nicht ganz so stark wie bei HCl. Bei dreiwertigen Kationen Al, Ce ist der Unterschied bei der Variation der Konzentration im allgemeinen nicht viel kleiner als bei den zweiwertigen Kationen. Der theoretisch zu erwartende Maximalwert für einen Konzentrationsunterschied mit dem Verhältnis 1:5 sollte etwa 13 Millivolt betragen. Dieser Wert wird aber in Wahrheit oft deutlich überschritten. Bei der Unsicherheit

Tabelle III.

		I	Diff.	II	Diff.	III	Diff.	IV	Diff.
n/10		49,2	21,1	28,4	34,6	18,3	34,5	30,6	31,6
n/50		70,3	38,0	63,0	27,0	52,8	37,2	62,2	35,2
n/250		108,3	37,7	90,0	26,8	90,0	35,5	97,4	33,6
n/1250	K Cl	146,0	40,0	116,8	26,1	125,5	34,9	131,0	37,0
n/250		106,0	40,5	90,7	29,6	90,6	38,2	94,0	38,4
n/50		65,5	32,4	61,1	34,9	52,4	33,6	55,6	33,8
n/10		33,1		26,2		18,8		21,8	
n/10		43,2	35,0	39,4	32,6	33,2	39,0	—	—
n/50		78,2	36,6	72,0	42,8	72,2	38,7	—	—
n/250		114,8	33,7	114,8	25,2	111,1	37,9	—	—
n/1250	Na Cl	148,5	39,3	140,0	35,0	149,0	34,2	—	—
n/250		109,2	39,2	105,0	32,9	114,8	41,6	—	—
n/50		70,0	35,0	72,1	33,8	73,2	29,7	—	—
n/10		35,0		38,8		43,5		—	
n/10		66,6	34,4	65,0	28,5	—	—	—	—
n/50		101,0	34,0	93,5	31,0	—	—	—	—
n/250		135,0	26,3	124,5	26,7	—	—	—	—
n/1250	Li Cl	161,3	37,3	151,2	34,8	—	—	—	—
n/250		124,0	36,2	116,4	34,2	—	—	—	—
n/50		87,8	34,1	82,2	39,3	—	—	—	—
n/10		53,7		42,9		—		—	
n/10		28,4	30,4	19,5	31,4	—	—	—	—
n/50		58,8	37,8	50,9	34,1	—	—	—	—
n/250		96,6	21,6	85,0	35,0	—	—	—	—
n/1250	Rb Cl	118,2	34,4	120,0	37,0	—	—	—	—
n/250		83,8	35,0	83,0	35,6	—	—	—	—
n/50		48,8	29,7	47,4	29,5	—	—	—	—
n/10		19,1		17,9		—		—	
n/10		45,0	31,0	37,0	32,5	37,0	26,0	—	—
n/50		76,0	33,0	69,5	36,5	63,0	34,0	—	—
n/250		109,0	34,0	106,0	33,0	97,0	32,0	—	—
n/1250	NH_4Cl	143,0	36,0	139,0	38,0	129,0	37,0	—	—
n/250		107,0	41,0	101,0	37,0	92,0	37,0	—	—
n/50		66,0	30,0	64,0	35,0	55,0	26,0	—	—
n/10		36,0		29,0		29,0		—	
n/10		41,4	12,2	65,5	6,0	82,2	13,0	63,7	11,3
n/50		53,6	16,9	71,5	19,1	95,2	14,3	75,0	4,7
n/250		70,5	20,5	90,6	20,4	109,5	13,5	79,7	28,3
n/1250	$CaCl_2$	91,0	17,4	111,0	18,6	123,0	16,9	108,0	8,0
n/250		73,6	21,1	92,4	19,9	106,1	18,5	100,0	15,0
n/50		52,5	15,9	72,5	11,4	87,6	9,8	85,0	11,8
n/10		36,6		61,1		77,8		73,2	
n/10		42,8	11,9	95,4	7,6	48,4	21,6	71,5	10,1
n/50		54,7	21,0	103,0	15,8	70,0	19,8	81,6	20,6
n/250		75,7	21,8	118,8	16,0	89,8	21,4	102,2	19,8
n/1250	$MgCl_2$	97,5	19,0	134,8	18,0	111,2	18,8	122,0	18,0
n/250		78,5	18,8	116,8	17,6	92,4	16,9	104,0	20,6
n/50		59,7	11,7	99,2	16,4	75,5	15,0	83,4	10,4
n/10		48,0		82,8		60,5		73,0	

Tabelle III (Fortsetzung).

		I	Differenz	II	Differenz	III	Differenz
n/10	$BaCl_2$	78,9	6,5	80,0	7,2	56,8	11,9
n/50		85,4	17,4	87,2	9,7	68,7	18,7
n/250		102,8	18,2	96,9	25,0	87,4	21,4
n/1250		121,0	17,8	121,9	27,4	108,8	19,8
n/250		103,2	21,6	94,5	14,9	89,0	19,3
n/50		81,6	12,4	79,6	13,4	69,7	11,1
n/10		69,2		66,2		58,6	
n/10	$AlCl_3$	76,5	3,9	92,6	6,7	109,8	5,4
n/50		80,4	18,3	99,3	9,0	115,2	10,8
n/250		98,7	22,9	108,3	19,5	126,0	17,0
n/1250		121,6	19,5	127,8	19,7	143,0	21,3
n/250		102,1	21,1	108,1	14,7	121,7	14,9
n/50		81,0	1,0	93,4	11,9	106,8	5,6
n/10		80,0		81,5		101,2	
n/10	$CeCl_3$	110,0	19,0	100,0	18,0	94,0	11,0
n/50		129,0	13,0	118,0	15,0	105,0	14,0
n/250		142,0	15,0	133,0	20,0	119,0	11,0
n/1250		157,0	17,0	153,0	16,0	130,0	20,0
n/250		140,0	12,0	137,0	12,0	110,0	15,0
n/50		128,0	15,0	125,0	16,0	95,0	18,0
n/10		113,0		109,0		77,0	
n/10	HCl	— 22,0	2,2	18,0	8,9	— 16,5	6,7
n/50		— 19,8	13,9	26,9	23,7	— 9,8	15,5
n/250		— 5,9	39,7	50,6	33,0	5,7	38,4
n/1250		33,8	37,4	83,6	31,5	44,1	30,0
n/250		— 3,6	16,1	52,1	28,5	14,1	21,3
n/50		— 19,7	0,9	23,6	9,0	— 7,2	0,4
n/10		— 18,8		14,6		— 7,6	
1 proz.	Chinin hydroch.	91,6	28,4	81,5	33,5	—	—
1/5 ,,		120,0	5,0	115,0	23,4	—	—
1/25 ,,		125,0	41,0	138,4	15,6	—	—
1/125 ,,		166,0	22,0	154,0	25,3	—	—
1/25 ,,		144,0	39,2	128,7	18,3	—	—
1/5 ,,		104,8	14,4	110,4	26,6	—	—
1 ,,		90,4		83,8		—	

unserer Kenntnisse über die Dissoziation und Aktivität solcher dreiwertigen Ionen sind solche Unterschiede nicht auffällig und einer genauen Theorie nicht zugänglich. Die letzte Versuchsreihe ist mit Chininhydrochlorid angestellt. Hier sind die Unterschiede weniger regelmäßig.

Die nächste Versuchsreihe wurde mit Kaliumsalzen verschiedener Anionen, jedes Salz in verschiedenen Konzentrationen, angestellt. An dieser Versuchsreihe ist die große Einförmigkeit ganz auffällig. Ein-, zwei-, dreiwertige Anionen einschließlich des OH-Ions verhalten sich ganz gleich, und es ist ganz augenscheinlich, daß die Natur des Anions keine Rolle spielt, während wir bei den Kationen deutliche Unterschiede je nach der Wertigkeit leicht erkennen konnten.

Tabelle III.

		I	Diff.	II	Diff.	III	Diff.	IV	Diff.
n/10		49,2	21,1	28,4	34,6	18,3	34,5	30,6	31,6
n/50		70,3	38,0	63,0	27,0	52,8	37,2	62,2	35,2
n/250		108,3	37,7	90,0	26,8	90,0	35,5	97,4	33,6
n/1250	KCl	146,0	40,0	116,8	26,1	125,5	34,9	131,0	37,0
n/250		106,0	40,5	90,7	29,6	90,6	38,2	94,0	38,4
n/50		65,5	32,4	61,1	34,9	52,4	33,6	55,6	33,8
n/10		33,1		26,2		18,8		21,8	
n/10		43,2	35,0	39,4	32,6	33,2	39,0	—	—
n/50		78,2	36,6	72,0	42,8	72,2	38,7	—	—
n/250		114,8	33,7	114,8	25,2	111,1	37,9	—	—
n/1250	NaCl	148,5	39,3	140,0	35,0	149,0	34,2	—	—
n/250		109,2	39,2	105,0	32,9	114,8	41,6	—	—
n/50		70,0	35,0	72,1	33,8	73,2	29,7	—	—
n/10		35,0		38,8		43,5		—	
n/10		66,6	34,4	65,0	28,5	—	—	—	—
n/50		101,0	34,0	93,5	31,0	—	—	—	—
n/250		135,0	26,3	124,5	26,7	—	—	—	—
n/1250	LiCl	161,3	37,3	151,2	34,8	—	—	—	—
n/250		124,0	36,2	116,4	34,2	—	—	—	—
n/50		87,8	34,1	82,2	39,3	—	—	—	—
n/10		53,7		42,9		—		—	
n/10		28,4	30,4	19,5	31,4	—	—	—	—
n/50		58,8	37,8	50,9	34,1	—	—	—	—
n/250		96,6	21,6	85,0	35,0	—	—	—	—
n/1250	RbCl	118,2	34,4	120,0	37,0	—	—	—	—
n/250		83,8	35,0	83,0	35,6	—	—	—	—
n/50		48,8	29,7	47,4	29,5	—	—	—	—
n/10		19,1		17,9		—		—	
n/10		45,0	31,0	37,0	32,5	37,0	26,0	—	—
n/50		76,0	33,0	69,5	36,5	63,0	34,0	—	—
n/250		109,0	34,0	106,0	33,0	97,0	32,0	—	—
n/1250	NH_4Cl	143,0	36,0	139,0	38,0	129,0	37,0	—	—
n/250		107,0	41,0	101,0	37,0	92,0	37,0	—	—
n/50		66,0	30,0	64,0	35,0	55,0	26,0	—	—
n/10		36,0		29,0		29,0		—	
n/10		41,4	12,2	65,5	6,0	82,2	13,0	63,7	11,3
n/50		53,6	16,9	71,5	19,1	95,2	14,3	75,0	4,7
n/250		70,5	20,5	90,6	20,4	109,5	13,5	79,7	28,3
n/1250	$CaCl_2$	91,0	17,4	111,0	18,6	123,0	16,9	108,0	8,0
n/250		73,6	21,1	92,4	19,9	106,1	18,5	100,0	15,0
n/50		52,5	15,9	72,5	11,4	87,6	9,8	85,0	11,8
n/10		36,6		61,1		77,8		73,2	
n/10		42,8	11,9	95,4	7,6	48,4	21,6	71,5	10,1
n/50		54,7	21,0	103,0	15,8	70,0	19,8	81,6	20,6
n/250		75,7	21,8	118,8	16,0	89,8	21,4	102,2	19,8
n/1250	$MgCl_2$	97,5	19,0	134,8	18,0	111,2	18,8	122,0	18,0
n/250		78,5	18,8	116,8	17,6	92,4	16,9	104,0	20,6
n/50		59,7	11,7	99,2	16,4	75,5	15,0	83,4	10,4
n/10		48,0		82,8		60,5		73,0	

Tabelle III (Fortsetzung).

		I	Differenz	II	Differenz	III	Differenz
n/10	$BaCl_2$	78,9	6,5	80,0	7,2	56,8	11,9
n/50		85,4	17,4	87,2	9,7	68,7	18,7
n/250		102,8	18,2	96,9	25,0	87,4	21,4
n/1250		121,0	17,8	121,9	27,4	108,8	19,8
n/250		103,2	21,6	94,5	14,9	89,0	19,3
n/50		81,6	12,4	79,6	13,4	69,7	11,1
n/10		69,2		66,2		58,6	
n/10	$AlCl_3$	76,5	3,9	92,6	6,7	109,8	5,4
n/50		80,4	18,3	99,3	9,0	115,2	10,8
n/250		98,7	22,9	108,3	19,5	126,0	17,0
n/1250		121,6	19,5	127,8	19,7	143,0	21,3
n/250		102,1	21,1	108,1	14,7	121,7	14,9
n/50		81,0	1,0	93,4	11,9	106,8	5,6
n/10		80,0		81,5		101,2	
n/10	$CeCl_3$	110,0	19,0	100,0	18,0	94,0	11,0
n/50		129,0	13,0	118,0	15,0	105,0	14,0
n/250		142,0	15,0	133,0	20,0	119,0	11,0
n/1250		157,0	17,0	153,0	16,0	130,0	20,0
n/250		140,0	12,0	137,0	12,0	110,0	15,0
n/50		128,0	15,0	125,0	16,0	95,0	18,0
n/10		113,0		109,0		77,0	
n/10	HCl	— 22,0	2,2	18,0	8,9	— 16,5	6,7
n/50		— 19,8	13,9	26,9	23,7	— 9,8	15,5
n/250		— 5,9	39,7	50,6	33,0	5,7	38,4
n/1250		33,8	37,4	83,6	31,5	44,1	30,0
n/250		— 3,6	16,1	52,1	28,5	14,1	21,3
n/50		— 19,7	0,9	23,6	9,0	— 7,2	0,4
n/10		— 18,8		14,6		— 7,6	
1 proz.	Chinin hydroch.	91,6	28,4	81,5	33,5	—	—
1/5 „		120,0	5,0	115,0	23,4	—	—
1/25 „		125,0	41,0	138,4	15,6	—	—
1/125 „		166,0	22,0	154,0	25,3	—	—
1/25 „		144,0	39,2	128,7	18,3	—	—
1/5 „		104,8	14,4	110,4	26,6	—	—
1 „		90,4		83,8		—	

unserer Kenntnisse über die Dissoziation und Aktivität solcher dreiwertigen Ionen sind solche Unterschiede nicht auffällig und einer genauen Theorie nicht zugänglich. Die letzte Versuchsreihe ist mit Chininhydrochlorid angestellt. Hier sind die Unterschiede weniger regelmäßig.

Die nächste Versuchsreihe wurde mit Kaliumsalzen verschiedener Anionen, jedes Salz in verschiedenen Konzentrationen, angestellt. An dieser Versuchsreihe ist die große Einförmigkeit ganz auffällig. Ein-, zwei-, dreiwertige Anionen einschließlich des OH-Ions verhalten sich ganz gleich, und es ist ganz augenscheinlich, daß die Natur des Anions keine Rolle spielt, während wir bei den Kationen deutliche Unterschiede je nach der Wertigkeit leicht erkennen konnten.

Tabelle IV.

		I	Differenz	II	Differenz	III	Differenz
n/10	KBr	46,2	32,3	9,7	31,5	17,8	31,8
n/50		78,5	35,7	41,2	39,8	49,6	34,7
n/250		114,2	34,8	81,0	36,0	84,3	36,7
n/1250		149,0	39,5	117,0	32,0	121,0	38,2
n/250		109,5	38,0	85,0	37,2	82,8	36,6
n/50		71,5	36,1	47,8	31,5	46,2	31,6
n/10		35,4		16,3		14,6	
n/10	KJ	30,8	31,9	10,6	31,3	14,3	33,0
n/50		62,7	35,7	41,9	37,0	47,3	37,0
n/250		98,4	36,1	78,9	35,3	84,3	38,7
n/1250		134,5	36,7	114,2	36,8	123,0	39,3
n/250		97,8	37,0	77,4	36,8	83,7	36,4
n/50		60,8	37,8	40,6	35,7	47,3	32,7
n/10		23,0		4,9		14,6	
n/10	KSCN	27,5	37,1	52,2	23,5	25,2	34,8
n/50		64,6	36,4	75,7	34,5	60,0	35,5
n/250		101,0	34,8	110,2	30,0	95,5	36,5
n/1250		135,8	37,0	140,2	38,0	132,0	37,5
n/250		98,8	37,0	102,2	37,7	94,5	38,3
n/50		61,8	36,0	64,5	36,9	56,2	32,6
n/10		25,8		27,6		23,6	
n/10	KNO_3	53,2	29,6	40,8	30,0	—	—
n/50		82,8	33,2	70,8	32,4	—	—
n/250		116,0	38,0	103,2	31,8	—	—
n/1250		154,0	38,0	135,2	39,8	—	—
n/250		116,0	39,6	95,2	37,8	—	—
n/50		76,4	34,6	57,4	34,7	—	—
n/10		41,8		22,7		—	
n/10	KNO_3	53,2	29,6	40,8	30,0	—	—
n/50		82,8	33,2	70,8	32,4	—	—
n/250		116,0	38,0	103,2	31,8	—	—
n/1250		154,0	38,0	135,0	39,8	—	—
n/250		116,0	39,6	95,2	37,8	—	—
n/50		76,4	34,6	57,4	34,7	—	—
n/10		41,8		22,7		—	
n/10	KJO_3	55,0	32,0	55,0	32,0	58,0	34,0
n/50		87,0	31,0	87,0	35,0	92,0	33,0
n/250		118,0	35,0	122,0	33,0	123,0	33,0
n/1250		153,0	37,0	155,0	38,0	156,0	36,0
n/250		114,0	35,0	117,0	35,0	120,0	37,0
n/50		79,0	32,0	82,0	31,0	83,0	31,0
n/10		47,0		51,0		52,0	
n/10	K_2CO_3	30,4	31,0	8,5	32,7	38,3	30,7
n/50		61,4	33,7	41,2	39,5	69,0	38,2
n/250		95,1	38,7	80,7	34,1	107,2	36,8
n/1250		134,0	38,6	114,8	33,2	144,0	41,1
n/250		95,4	40,3	81,6	34,8	102,9	35,6
n/50		55,1	36,2	46,8	33,2	67,3	36,1
n/10		18,9		13,6		31,2	

Tabelle IV (Fortsetzung).

		I	Differenz	II	Differenz	III	Differenz
n/10	K_2SO_4	37,1	33,1	15,9	35,4	30,8	32,5
n/50		70,2	35,8	51,3	33,5	63,3	36,9
n/250		106,0	35,2	84,8	31,2	100,2	34,3
n/1250		141,2	37,2	116,0	22,3	134,5	34,5
n/250		104,0	35,0	93,7	47,2	100,0	36,0
n/50		69,0	35,1	46,5	35,4	64,0	31,6
n/10		33,9		11,1		32,4	
n/10	K_3-Ferricyanid	19,3	36,7	14,2	32,0	—	—
n/50		56,0	33,7	46,2	35,4	—	—
n/250		89,7	37,3	81,6	35,6	—	—
n/1250		127,0	37,5	117,2	35,7	—	—
n/250		89,5	38,0	81,5	34,1	—	—
n/50		51,5	35,5	47,4	34,2	—	—
n/10		16,0		13,2		—	
n/10	K_4-Ferrocyanid	16,9	33,1	15,4	34,0	—	—
n/50		50,0	36,4	49,4	35,1	—	—
n/250		86,4	33,8	84,5	31,7	—	—
n/1250		120,2	33,8	116,2	32,0	—	—
n/250		86,4	32,7	84,2	34,8	—	—
n/50		53,7	35,2	49,4	35,5	—	—
n/10		18,5		13,9		—	
n/10	KOH	– 1,9	37,5	36,4	34,6	10,3	35,2
n/50		35,6	41,8	71,0	39,6	45,5	42,2
n/250		77,4	40,1	110,6	37,4	87,7	37,3
n/1250		117,5	39,5	148,0	39,0	125,0	42,0
n/250		78,0	40,0	109,0	42,4	83,0	36,0
n/50		38,0	37,4	66,6	39,0	47,0	39,7
n/10		0,6		27,6		7,3	
n/10	K-Acetat	4,5	33,2	9,5	33,5	—	—
n/50		37,7	37,9	43,0	37,0	—	—
n/250		75,6	34,4	80,0	40,3	—	—
n/1250		110,0	33,4	120,3	39,5	—	—
n/250		76,6	35,8	80,8	36,8	—	—
n/50		40,8	34,6	44,0	34,1	—	—
n/10		6,2		9,9		—	
n/10	K_2-Oxalat	18,6	34,9	16,1	30,7	—	—
n/50		53,5	37,5	46,8	35,1	—	—
n/250		91,0	31,8	81,9	34,6	—	—
n/1250		122,8	30,1	116,5	33,9	—	—
n/250		92,7	34,9	82,6	35,4	—	—
n/50		57,8	35,2	47,2	34,0	—	—
n/10		22,6		13,2		—	
n/10	K_3-Citrat	24,2	32,8	12,2	32,3	—	—
n/50		57,0	35,0	44,5	36,0	—	—
n/250		92,0	37,0	80,5	37,5	—	—
n/1250		129,0	36,8	118,0	35,4	—	—
n/250		92,2	33,7	82,6	35,4	—	—
n/50		58,5	34,3	47,2	32,9	—	—
n/10		24,2		14,3		—	

Die nächste Versuchsreihe soll den Unterschied der verschiedenen Kationenarten bei gleicher Konzentration, alle an *einem* Apfel untersucht, feststellen. Die früheren Versuche sind nämlich nur für die Frage des Konzentrationseffekts an einem gegebenen Elektrolyten geeignet, aber nicht für die Vergleichung verschiedener Ionen*arten*, weil für die verschiedenen Ionenarten verschiedene Äpfel angewendet wurden. Um das individuelle Verhalten der einzelnen Äpfel auszuschalten, mußte man an einem und demselben Apfel die Untersuchungen mit gleich konzentrierten Lösungen der verschiedenen Elektrolyte rasch hintereinander anstellen. In der Tabelle V bedeutet jede horizontale Reihe von 21 Versuchen die Messungen an *einem* Apfel, der Pfeil bedeutet die Richtung, in welcher die verschiedenen Elektrolyte hintereinander benutzt wurden. In der untersten horizontalen Reihe ist das Mittel aus den Versuchen mit verschiedenen Äpfeln angegeben. Wir erkennen eine deutliche Ionenreihe der Kationen

$$- \quad H, \; Rb, \; K, \; Na, \; Li, \; Ca, \; Ba, \; Mg, \; Al \quad +$$

Bei der Variation der Anionen in Form ihrer Kaliumsalze sind die Unterschiede viel kleiner, Cl, Br, J, Nitrat, Carbonat, Sulfat, Ferricyanid, OH unterscheiden sich untereinander in der Wirkung so wenig, daß die Unterschiede kaum die Versuchsfehler überschreiten. Etwas verschieden von diesen, aber unter sich ziemlich gleichartig, sind Ferrocyanid, Acetat, Oxalat, Citrat und Rhodanid. Die Versuche sind ziemlich gut reproduzierbar und von der Reihenfolge, in welcher die Äpfel mit verschiedenen Lösungen in Berührung gebracht wurden, ziemlich unabhängig. Das erkennt man aus folgendem: Sämtliche untersuchten 21 Salze wurden in der angegebenen Reihenfolge an *einem* Apfel hintereinander angewendet und diese ganze Versuchsreihe an fünf verschiedenen Äpfeln wiederholt. Die Reihenfolge der Salze wurde dabei entsprechend den Pfeilen in den Protokollen bald in der einen, bald in der anderen Richtung getroffen. Wiederum zeigen sich die individuellen Unterschiede der Äpfel. Aber die Unterschiede der Potentialdifferenzen der verschiedenen Salze bei *einem* Apfel zeigen im großen immer dasselbe Bild. Wenn man bedenkt, daß diese 21 Versuche in sehr kurzen Abständen hintereinander immer an einem Apfel ausgeführt wurden und daß das definitive Potential sicherlich noch nicht jedesmal eingestellt war, ist man wohl zu dem Schlusse berechtigt, daß die absoluten Werte der Potentiale bei verschiedenen Äpfeln individuell sind, daß aber der Unterschied der Wirkung je zweier Salze bei einem Apfel ziemlich konstant ist. Daher können wir ein Durchschnittsbild der Wirkung erhalten, wenn wir für jedes Salz aus den Beobachtungen mit den fünf Äpfeln das Mittel nehmen. Die Mittelwerte ergeben deutlich die obengenannte Reihe. Für die Anionen

sind die Unterschiede so gering, daß wir nur sagen können: zwischen Br, J, Sulfat, Carbonat, Cl, Nitrat, OH, Ferricyanid sind die Differenzen vom ersten bis zum letzten Glied der Reihe nur 3,8 Millivolt, was praktisch wohl innerhalb der Versuchsfehler = 0 zu setzen ist, und nur Acetat, Ferrocyanid, Oxalat, Citrat, Rhodanid weichen etwas ab, im höchsten Falle bei Rhodanid um 9 Millivolt, gegenüber dem Wert des Chlorids. Aus alledem ergibt sich, daß eine sichere Anionenreihe nicht feststellbar ist. Die Unterschiede sind zu gering im Gegensatz zu den Kationen, wo der Unterschied zwischen dem ersten und letzten Glied der Reihe (H und Al) 60 Millivolt beträgt.

Tabelle V.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	HCl	$RbCl$	KCl	$NaCl$	$LiCl$	$CaCl_2$	$BaCl_2$	$MgCl_2$	$AlCl_3$
→	7,0	24,5	35,8	43,7	46,2	53,7	50,2	61,5	63,6
→	− 2,9	18,3	24,0	30,2	30,2	42,7	41,7	52,3	56,2
←	− 8,9	11,4	10,5	22,8	37,4	37,8	40,2	42,9	57,4
←	−13,9	6,7	18,8	30,2	31,0	45,0	47,8	47,2	52,7
→	− 5,1	15,1	13,0	23,2	35,3	31,5	35,5	39,0	49,8
Mittel	− 4,76	15,20	20,42	30,02	36,02	42,14	43,08	48,58	55,94

	10	11	12	13	14	15	16	17	18
	KBr	KJ	$KSCN$	KNO_3	K_2CO_3	K_2SO_4	K_3-Ferricyanid	K_4-Ferrocyanid	KOH
→	23,2	21,0	31,2	20,7	18,6	18,0	17,3	19,5	10,3
→	13,9	16,7	25,8	16,1	14,2	13,0	13,6	16,5	9,5
←	12,5	17,5	32,5	25,7	29,3	32,0	34,6	42,6	36,8
←	11,3	11,1	24,9	20,0	24,4	25,2	30,4	38,2	34,4
→	26,2	25,4	33,2	21,9	16,9	13,2	10,1	15,8	14,3
Mittel	17,42	18,34	29,52	20,88	20,68	20,28	21,20	26,52	21,06

	19	20	21
	K-Acetat	K_2-Oxalat	K_3-Citrat
→	14,0	16,5	16,2
→	12,9	15,4	15,4
←	40,7	45,0	46,0
←	37,8	41,8	43,2
→	15,9	20,9	22,2
Mittel	24,26	27,92	28,60

Die nächste Versuchsreihe beschäftigt sich ausführlicher mit HCl und NaOH, um noch einmal besonders festzustellen, ob H- oder OH-Ionen irgend eine exzeptionelle Wirkung ausüben. Die Versuche bestanden darin, daß eine gegebene KCl-Lösung verglichen wurde mit

einer gleichen KCl-Lösung, welche eine sehr kleine Menge HCl oder KOH enthielt. Bei Potentialbildungen, welche in exzeptioneller Weise nur oder fast nur von den H-Ionen bewirkt werden, wie bei der *Haber*schen Gaskette, müßte der Zusatz von HCl oder KOH einen sehr großen Einfluß haben. Ist aber die Wirkung der H-Ionen von gleicher Größenordnung wie die anderer Kationen, so kann der Unterschied nur klein sein. In der Tabelle VI ist eine Reihe von Versuchen folgendermaßen angeordnet: je ein Apfel wurde hintereinander mit den Lösungen a), b), c), d) untersucht. Der Vergleich des Versuchs a) und d), die Rückkehr zu der Ausgangslösung zeigt, daß die Reversibilität des Versuchs nicht vollkommen ist. In Anbetracht dessen muß man auch sagen, daß der Zusatz von Säure und Lauge keine sicher erkennbare Wirkung hat. Insbesondere ist der Übergang von n/1000 HCl zur n/1000 KOH fast wirkungslos. Daraus erkennt man, daß den H- und OH-Ionen bei der Potentialbildung in keiner Weise eine exzeptionelle Rolle zukommt.

Tabelle VI.

I.			
a) n/20 KCl	71,6	56,0	37,2
b) n/20 KCl + n/1000 HCl . . .	61,8	45,6	30,3
c) n/20 KCl + n/1000 KOH . .	68,1	50,7	34,5
d) n/20 KCl	60,5	47,8	28,4
II.			
a) n/10 KCl	55,1	37,6	18,1
b) n/10 KCl + n/1000 HCl . . .	49,4	35,4	15,2
c) n/10 KCl + n/1000 KOH . .	48,7	35,2	13,9
d) n/10 KCl	43,8	35,6	12,6
III.			
a) n/10 KCl	40,0	33,6	12,1
b) n/10 KCl + n/100 HCl . . .	28,7	26,2	2,7
c) n/10 KCl + n/100 KOH . .	32,6	32,2	4,3
d) n/10 KCl	30,0	29,4	5,3

	I	II	III	IV
n/100 HCl	16,2	— 5,9	36,8	18,8
n/100 HCl + n/10 KCl	18,3	— 3,0	35,8	24,3
n/100 HCl + n KCl	9,3	8,4	30,7	23,8
n/100 KOH	66,9	60,0	71,7	73,0
n/10 HCl	— 13,4	— 19,2	— 12,8	— 3,6
n/10 HCl + n/10 KCl	— 4,3	— 8,5	— 12,1	4,0
n/10 HCl + n KCl	11,8	10,2	24,4	17,8
n/10 KOH	19,3	4,7	28,7	11,1

Die nächsten Versuche sollen feststellen, inwieweit ausgesprochene Zellgifte die Potentialdifferenz beeinflussen. Die Tabelle VII zeigt Versuche mit einem Apfel, welcher 12 Stunden in Formollösung verschiedener Konzentration gestanden hatte. Einige herausgegriffene

Tabelle VII.

	KCl		NaCl		CaCl$_2$	
	Potentialdiff.	Differenz	Potentialdiff.	Differenz	Potentialdiff.	Differenz
Versuche m. Apfel, d. in Formol (100 f. Verd.) über Nacht eingetaucht wurde.						
n/10	10,0	28	16,0	32	30	9
n/50	38,0	36	48,0	37	39	25
n/250	74,0	36	85,0	34	64	32
n/1250	110,0	35	119,0	36	96	32
n/250	75,0	31	83,0	36	64	23
n/50	44,0	40	47,0	34	41	19
n/10	4,0		13,0		22	
In Formol (10 fache Verdünnung) über Nacht eingetaucht.						
n/10	— 2	24	0	29	9	8
n/50	22	33	29	35	17	27
n/250	55	34	64	31,5	44	22
n/1250	89	31	95,5	30,5	66	21
n/250	58	35	65	35	45	18,5
n/50	23	29	30	31	26,5	14,5
n/10	— 6		— 1		12	
	K$_2$SO$_4$		HCl			
n/10	— 16,0	27	— 36	4,5	—	—
n/50	11	36	— 31,5	19,5	—	—
n/250	47	37	— 12,0	32	—	—
n/1250	84	40	20,0	22	—	—
n/250	44	28	— 2,0	23	—	—
n/50	16	31	— 25,0	10	—	—
n/10	— 15		— 35,0		—	
In Sublimat 1 : 1000 über Nacht getaucht.						
	KCl		CaCl$_2$		K$_2$SO$_4$	
n/10	34	25	53	7	27	28
n/50	59	30	60	23	55	32
n/250	89	37	83	16	87	30
n/1250	126	39	99	21	117	29
n/250	87	30	78	13	88	29
n/50	57	30	65	13	59	34
n/10	27		52		25	
	HCl		KOH			
n/10	1	12	26	36	—	—
n/50	13	29	62	34	—	—
n/250	42	35	96	31	—	—
n/1250	77	36	127	32	—	—
n/250	41	22	95	35	—	—
n/50	19	16	60	36	—	—
n/10	3		24		—	
In Äther über Nacht eingetauchter Apfel (bräunlich verfärbt).						
	KCl		CaCl$_2$		K$_2$SO$_4$	
n/10	— 9	24	15	7,5	— 17	32
n/50	15	32	22,5	10,0	15	34
n/250	47	40	32,5	28,5	49	32
n/1250	87	41,5	61	21,5	81	33
n/250	45,5	31,5	39,5	17,7	48	33
n/50	14	24,5	21,8	6,8	15	32
n/10	— 10,5		15		— 17	

Tabelle VII (Fortsetzung).

	HCl		KOH			
	Potentialdiff.	Differenz	Potentialdiff.	Differenz	Potentialdiff.	Differenz
n/10	—41	9	—20	40	—	—
n/50	—32	23	20	34	—	—
n/250	— 9	36	54	30	—	—
n/1250	27	33	84	31	—	—
n/250	— 6	23	53	35	—	—
n/50	—29	21	18	38	—	—
n/10	—40		—20		—	
In KOH (n/10) über Nacht eingetaucht.						
	KCl		$CaCl_2$		K_2SO_4	
n/10	— 3	33	8,0	19	1,0	33
n/50	30	32	27	22,5	34	32
n/250	62	36	49,5	23,5	67	32
n/1250	98	35	73	26	99	29
n/250	63	33	47	19	70	34
n/50	30	31,5	28	20	36	35
n/10	— 1,5		8		1,0	
	HCl		KOH			
n/10	—35	2	— 8	23	—	—
n/50	—33	16	31	33	—	—
n/250	—17	28	64	33	—	—
n/1250	11	22	97	33,5	—	—
n/250	—11	18	63,5	34,5	—	—
n/50	—29	6	29	35	—	—
n/10	—35		— 8		—	
In HCl (n/10) über Nacht eingetauchter Apfel.						
	KCl		$CaCl_2$		K_2SO_4	
n/10	62	18	70	14	47	35
n/50	80	35	84	18	82	31
n/250	115	39	102	8	113	40
n/1250	154	39	110	11	153	38
n/250	115	38	99	16,5	115	33
n/50	77	28	82,5	12,5	82	33
n/10	49		70		49	
	HCl		KOH			
n/10	20	5	34	41	—	—
n/50	25	38	75	40	—	—
n/250	63	27	115	37	—	—
n/1250	90	30	152	39	—	—
n/250	60	32	113	41	—	—
n/50	28	12	72	42,5	—	—
n/10	16		29,5		—	
In Alkohol (70 proz.) über Nacht eingetaucht.						
	KCl		$CaCl_2$		K_2SO_4	
n/10	87	30	86	13	58	32
n/50	117	23	99	20	90	35
n/250	140	27	119	23	125	25
n/1250	167	30	142	23	150	40
n/250	137	37	119	24	110	20
n/50	100	33	95	16	90	46
n/10	67		79		44	

Tabelle VII (Fortsetzung).

	HCl		KOH			
	Potentialdiff.	Differenz	Potentialdiff.	Differenz	Potentialdiff.	Differenz
n/10	17	9	40	38	—	—
n/50	26	24	78	33	—	—
n/250	50	32	111	39	—	—
n/1250	82	29	150	39	—	—
n/250	53	24	111	39	—	—
n/50	29	14	72	37	—	—
n/10	15		35		—	

Gekochter Apfel.

	KCl		$CaCl_2$		K_2SO_4	
n/10	—9,5	20	14	6	—13	17
n/50	10,5	20,5	20	10	4	18
n/250	31	22	30	12	22	17
n/1250	53	25	42	13	39	19
n/250	28	20	29	11	20	16
n/50	8	11	18	3	4	16
n/10	—3		15		—12	
	HCl					
n/10	—35	12	—	—	—	—
n/50	—23	18	—	—	—	—
n/250	— 5	21	—	—	—	—
n/1250	16	18	—	—	—	—
n/250	— 2	17	—	—	—	—
n/50	—19	11	—	—	—	—
n/10	—30		—		—	

Versuche über den Konzentrationseffekt mit einigen Salzen zeigen, daß die Behandlung mit Formol ganz ohne Einfluß ist. Dasselbe ergibt sich bei vorheriger Behandlung mit Sublimat, nach 24stündiger Eintauchung in Äther, n/10 KOH, n/10 HCl und, etwas unvollkommener, nach Behandlung mit 70 proz. Alkohol. Die Wirkungslosigkeit dieser starken Eingriffe zeigt, daß die wirksame Membran keine protoplasmaähnliche Struktur haben kann. Diese Versuche sprechen durchaus dafür, daß die homogene lipoidartige, zellfreie Außenschicht des Apfels die Bedingungen für die Entstehung der Potentialdifferenzen abgibt. Selbst in einem Versuch, bei welchen der Apfel gekocht wurde, zeigt sich der Effekt nur vermindert, aber nicht vernichtet.

In der folgenden Tabelle VIII sind einige ähnliche Versuche mit der Melone (Cucumis Melo L.) in nunmehr leicht verständlicher Weise notiert. Wie man sieht, sind die Resultate bei weitem nicht so regelmäßig und erreichen die Potentialdifferenzen in der Regel nicht die hohen Werte wie beim Apfel. Obwohl die Versuche im großen und ganzen dasselbe erkennen lassen, sind doch die Resultate viel unregelmäßiger. Es mag sein, daß dieses auf einer größeren Verletzlichkeit der Membranen beruht. Jedenfalls ist der Apfel bei weitem vorzuziehen.

Tabelle VIII.

	KCl		$CaCl_2$		$MgCl_2$	
	Potentialdiff.	Differenz	Potentialdiff.	Differenz	Potentialdiff.	Differenz
n/10	96	10	142	— 12	155	— 6
n/50	106	18	130	3	149	— 2
n/250	124	16	133	17	147	14
n/1250	140	24	150	19	161	21
n/250	116	25	131	15	140	15
n/50	91	11	116	— 8	125	— 2
n/10	80		124		127	
	$AlCl_3$		KBr		K_2CO_3	
n/10	108	— 22	91	2	49	32
n/50	86	— 19	13	17	81	27
n/250	67	13	110	15	108	24
n/1250	80	17	125	20	132	33
n/250	63	4	105	25	99	30
n/50	59	— 16	80	20	69	36
n/10	75		60		33	

Zusammenfassung.

Die Potentialdifferenz der Apfelschale gegen eine wässerige Elektrolytlösung ist bei verschiedenen Äpfeln individuell verschieden, hängt aber bei *demselben* Apfel von der Art und der Konzentration der gelösten Elektrolyte ab. Variiert man nur die *Konzentration*, so erhält man einen Konzentrationseffekt, welcher bei einwertigen Kationen am größten und bei mehrwertigen Kationen kleiner ist, während die Wertigkeit des Anions belanglos ist. Variiert man bei gleicher Konzentration die Kationen, so erhält man eine deutlich ausgesprochene Kationenreihe mit H^+ bis Al^{+++} als Anfangs- und Endglied. Bei der Variation der Anionen sind die Unterschiede sehr gering, eine sichere Reihe kann nicht aufgestellt werden. Die H-Ionen unterscheiden sich in keiner Weise auffällig von anderen einwertigen Kationen. Diese Eigenschaft der Apfelschale wird selbst durch Vorbehandlung mit Äther, Formaldehyd, Sublimat nicht beeinflußt, und selbst durch Kochen nur vermindert.

Untersuchungen über elektrische Erscheinungen und Ionendurchlässigkeit von Membranen.

II. Mitteilung: Die Permeabilität der Apfelschale.

Von

Leonor Michaelis und **Akiji Fujita.**

(Aus dem biochemischen Institut der aichi-medizinischen Universität zu Nagoya, Japan.)

(Eingegangen am 8. Januar 1925.)

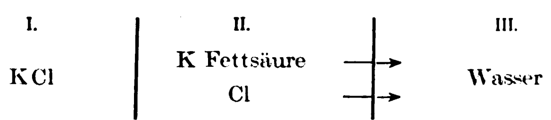
Aus den von *J. Loeb* und *Beutner*[1]) begonnenen und von *Beutner*[2]) im großen Umfang fortgesetzten Arbeiten geht hervor, daß an der Grenze der Apfelschale gegen eine Elektrolytlösung eine elektrische Potentialdifferenz sich einstellt, welche bei einem gegebenen Elektrolyten in gesetzmäßiger Weise von der Konzentration der Lösung abhängig ist und für mehrwertige Kationen kleiner als für einwertige ist, während das Anion belanglos ist. In der ersten Mitteilung über diesen Gegenstand bemerkten *Loeb* und *Beutner*, daß diese Tatsache wohl in dem Sinne gedeutet werden kann, daß die Schale für Kationen durchgängig und für Anionen undurchgängig sei. *Beutner* gab aber statt dessen lieber eine andere Deutung, welche in der Monographie von *Beutner* ausführlich erörtert wird, und das Potential wird als ein thermodynamisch zu erklärendes Verteilungspotential zwischen Phasen betrachtet. Die Bedingung für die Entstehung desselben ist, daß die Apfelschale aus einer ölartigen Substanz besteht, welche eine in Wasser unlösliche organische Säure enthält. Hierdurch wird bewirkt, daß in Berührung mit einer wässerigen Elektrolytlösung die Konzentration des Kations dieses Elektrolyten innerhalb der Apfelschale beinahe unabhängig von der Konzentration dieses Kations in Wasser ist. Aus dieser Annahme kann man die Potentialdifferenzen thermodynamisch herleiten. Nehmen wir vorläufig die Theorie von *Beutner* als richtig an, so

---

[1]) *J. Loeb* und *Beutner*, diese Zeitschr. **41**, 1, 1912.

[2]) *Beutner*, Die Entstehung elektrischer Ströme in lebenden Geweben. Stuttgart 1920.

glauben wir doch nicht, daß sie einen Gegensatz darstellt zu der Semipermeabilitätstheorie. Vergegenwärtigen wir uns, wie die Permeabilität der einzelnen Ionen sich gestalten müßte, wenn die *Beutner*sche Annahme zu Recht besteht.



In dem vorstehenden Schema ist I eine wässerige KCl-Lösung, III ist reines Wasser, II stellt das saure Öl dar. Bei Berührung mit der KCl-Lösung verteilt sich das KCl zunächst zwischen I und II, und es tritt eine sehr kleine Menge KCl in das Öl ein, entsprechend seiner sehr geringen Öllöslichkeit. Im Öle werden die Kaliumionen von den Ionen der Fettsäure in Beschlag genommen. Im Öle ist eine Fettsäure nicht oder nicht wesentlich schwächer als HCl, und daher bildet sich fettsaures Kalium. Das Gleichgewicht des Kaliums wird daher verschoben und es stellt sich derart ein, daß ungefähr das Kalium im Öle in einer der Fettsäure äquivalenten Menge vorhanden ist, während die Cl-Ionen nur in Spuren vorhanden sind. Für die Ausbildung der Potentialdifferenzen genügt es, wenn dieser Zustand nur in einer sehr dünnen Schicht des Öles unmittelbar an der Grenze gegen die wässerige KCl-Lösung hergestellt ist. Wenn man aber die Phasen lange genug in Berührung läßt, so daß die Ionen sich gemäß diesem Prinzip durch die ganze Schicht des Öles hindurch einstellen, so hat das eine verschiedene Permeabilität der Ionen aus dem Öle in die Phase III zur Folge. Diese dritte Phase wollen wir uns zunächst als reines Wasser vorstellen. Da die Cl-Ionen im Öle nur in äußerst geringer Konzentration vorhanden sind, ist auch der Diffusionsdruck der Cl-Ionen aus dem Öle in die Phase III nur äußerst klein. Die K-Ionen dagegen befinden sich im Öle in höherer Konzentration, und daher ist auch ihr Diffusionsdruck gegen das Wasser III größer. Das hat zur Folge, daß die K-Ionen mit größerem Druck in das Wasser zu diffundieren streben als die Cl-Ionen. Dies allein genügt jedoch nicht, um den K-Ionen wirklich eine meßbare schnellere Diffusion zu gestatten als den Cl-Ionen, wegen der dabei auftretenden elektrostatischen Kräfte. Wenn dagegen in dem Wasser III irgend ein anderer Elektrolyt vorhanden ist, so kann dessen Kation gegen das K-Ion ausgetauscht werden und es muß wirklich eine Diffusion eintreten. Dagegen ist zu erwarten, daß ein Austausch der Anionen nicht oder jedenfalls sehr viel langsamer eintritt.

Die Theorie von *Beutner* ist somit kein Widerspruch zu der Annahme, daß die Potentialdifferenz auf einer isolierten Permeabilität für die Kationen entsteht, sondern sie erklärt nur den Mechanismus dieser Semipermeabilität. Wir können somit an der von *Wi. Ostwald* be-

gründeten Anschauung festhalten, daß das Membranpotential auf einer beschränkten Ionenpermeabilität beruht, und diese Erklärung würde sogar gültig bleiben, auch wenn sich herausstellen sollte, daß die *Beutner*sche Erklärung des Mechanismus desselben modifiziert werden müßte.

Aber es ist notwendig, den *experimentellen Beweis* für diese Permeabilität für Kationen und Impermeabilität für Anionen zu erbringen. Ähnliche Versuche über beschränkte Permeabilität sind im großen Maßstab schon gemacht worden, und zwar meist an roten Blutkörperchen. Die Verhältnisse liegen hier offenbar sehr kompliziert. Zweifellos besteht hier eine verschiedene Permeabilität für einzelne Ionenarten. So hat *Gürber* gezeigt, daß die roten Blutkörperchen für Kalium und Natrium impermeabel sind. Aber die Kompliziertheit dieser Verhältnisse erscheint nach den neuesten Arbeiten nur noch größer[1]). Unter diesen Umständen erscheint uns die Apfelschale als ein viel einfacheres Objekt, an welchem die Frage der Ionensemipermeabilität viel leichter studiert werden kann. Wir werden in dieser Arbeit zeigen, daß man die Apfelschale nicht nur auf Grund der Erscheinung der elektrischen Potentialdifferenz, sondern auf Grund direkter Diffusionsversuche als eine Substanz auffassen kann, welche für beliebige Kationen permeabel und für beliebige Anionen impermeabel ist.

Zur Orientierung über die Permeabilität der Apfelschale für gelöste Substanzen überhaupt machten wir einen Vorversuch mit Acetonlösungen. Ein Apfel wurde in einem Becherglas in eine sehr verdünnte Acetonlösung versenkt. Das Volumen desselben war ungefähr gleich dem Volumen des Apfels. Das ganze Gefäß wurde in einem luftdicht verschlossenen Exsikkatorgefäß aufbewahrt, in welchem sich als Kontrolle ein zweites Becherglas mit der gleichen Acetonlösung ohne den Apfel befand. In bestimmten Intervallen wurden den beiden Acetonlösungen Proben zur Analyse entnommen. Es zeigte sich, daß auch nach 9 Tagen die Konzentration der Acetonlösung nicht abgenommen hatte. Genauer gesagt, war die außerordentlich geringfügige Abnahme nicht größer als in dem Versuch ohne Apfel (Tabelle I).

Tabelle I.
mg Aceton in je 5 ccm.

Zeit der Analyse in Tagen nach der Ansetzung	Acetonlösung, in einem verschlossenen Kolben aufbewahrt	Dieselbe Acetonlösung, im Exsikkatorraum im offenen Gefäß aufbewahrt	Dieselbe Acetonlösung, im Exsikkatorraum einen Apfel von etwa gleichem Volumen enthaltend
4	7,85	7,55	7,54
7	7,94	7,18	7,21
9	7,78	7,06	6,95

[1]) Vgl. *R. Ege*, diese Zeitschr. **130**, 116, 1922.

In Anbetracht dieser praktisch vollkommenen Undurchlässigkeit für Aceton muß es sehr auffällig erscheinen, daß unter richtigen Versuchsbedingungen eine Permeabilität für Kationen überhaupt nachweisbar war (aber nicht mit Sicherheit für Anionen). Diese Versuche wurden folgendermaßen ausgeführt.

Die erste Versuchsreihe bestand darin, daß ein Apfel unter ähnlichen Bedingungen wie in dem beschriebenen Versuch in destilliertes Wasser versenkt wurde. In mehrtägigen Intervallen wurde untersucht, ob irgend eins der in dem Apfelsaft vorhandenen Ionen in dem destillierten Wasser nachweisbar war. Das für die Analyse bequemste Ion ist das K-Ion, welches nach unserer Analyse in dem Preßsaft des Apfels in der Konzentration 0,466 mg K in 0,5 ccm (m/42) enthalten ist. Die Analyse wurde mit der Mikromethode nach *B. Kramer* und *F. F. Tisdall*[1]) ausgeführt. 10 Tage lang konnte in dem destillierten Wasser nicht die geringste Spur K^+ gefunden werden. Am 12. Tage fand sich eine nicht analysierbare Spur Kalium, welche sich bis zum 18. Tage nur bis auf 0,0046 mg Kalium in 5 ccm Wasser vermehrte, eine Menge, die zwar einen für das Auge (nach dem Zentrifugieren) erkennbaren gelblichen Niederschlag mit dem Natrium-Kobalt-Nitritreagenz entstehen ließ, deren Mengenangabe jedoch selbst für diese empfindlichste Mikromethode nur als Schätzung betrachtet werden kann (Tabelle II A).

Ganz ähnlich in den anderen Versuchen, z. B. in Tabelle II B und C, wo nach 11 Tagen noch nicht die geringste Spur K nachgewiesen werden konnte.

Wir finden also, daß bei der Diffusion gegen destilliertes Wasser praktisch eine Diffusion eines K-Salzes aus dem Apfel heraus nicht stattfindet. Ganz anders gestalten sich die Versuche, wenn wir den Apfel in eine Salzlösung versenken, welche aber kein K enthält. Solche Versuche wurden mit Lösungen von NaCl und Na-Acetat ausgeführt. Beispielsweise zeigt der Versuch (Tabelle II A) mit Na-Acetat am 4. Tage des Versuchs eine Spur Kalium, welche allmählich ansteigt und am 18. Tage für das bloße Auge einen sehr deutlichen Kobaltniederschlag gab und bei der Mikroanalyse einen Gehalt von 0,06 mg K in 5 ccm Lösung ergab. Dieser Befund wurde in allen Versuchen mit NaCl oder Na-Acetat bestätigt. Trotz der Langsamkeit der Diffusion ist der Übertritt des Kaliums zweifellos fortschreitend mit der Zeit nachweisbar, im Gegensatz zu den Versuchen mit destilliertem Wasser.

[1]) *B. Kramer* und *F. F. Tisdall*, The Journ. of biol. Chem. **46**, Nr. 2, 1921; **48**, Nr. 1, 1921.

Tabelle II.

	A: n/10 NaCl		A: n/10 Na-Acetat	A: Aqua dest.	B: n/10 NaCl		B: n/10 Na-Acetat	B: Aqua dest.
Volumen des Apfels .	275 ccm		253 ccm	169 ccm	169 ccm		159 ccm	182 ccm
Gewicht des Apfels . .	198,1472 g		184,485 g	221,0289 g	130,9703 g		121,7235 g	136,6704 g
Volumen der zugesetzten Lösung	250 ccm		250 ccm	300 ccm	160 ccm		160 ccm	160 ccm
Zeitdauer d. Eintauchens in Tagen	Cl' ccm von n/10 $AgNO_3$ in 5 ccm Lösung (mg in 5 ccm)	K˙ mg in 5 ccm	K˙ mg in 5 ccm	K mg in 5 ccm	Cl' ccm von n/10 $AgNO_3$ in 5 ccm Lösung (mg in 5 ccm)	K˙ mg in 5 ccm	K' mg in 5 ccm	K'' mg in 5 ccm
1					5,00 (17,73)	—	—	—
2	5,00 (17,73)	Spur	—	—				
3					5,00 (17,73)	Spur	Spur	—
4	5,00 (17,73)	Spur	Spur	—				
5					5,02 (17,80)	0,0110	0,0110	—
6	5,00 (17,73)	0,00568	Spur	—				
7					5,03 (17,84)	0,0326	0,0568	—
8	5,00 (17,73)	0,0775	0,00284	—				
9					5,03 (17,84)	0,0802	0,1240	—
10	5,00 (17,73)	0,0970	0,0163	—				
11					5,04 (17,87)	0,1245	0,1415	Spur
12	5,00 (17,73)	0,2040	0,0277	Spur				
13						0,1355	0,1840	Spur
14								
15					5,07 (17,98)	0,1540	0,2255	0,0064
16	5,05? (17,91)	0,2460	0,0628	0,00355				
17					5,05 (17,91)	0,1633	0,2680	0,0096
18	4,93 (17,48)	0,3765	0,0646	0,0046				
Gewicht d. Apfels nach 19 tägigem Eintauchen	198,8189		185,0078	220,9605	132,4300		123,0502	138,8540

Tabelle II C.

Zeitdauer des Eintauchens in Tagen	n/10 NaCl		n/10 Na-Acetat		Aqua dest.	
	Cl′ 5 ccm Lösung entsprechende ccm n/10 $AgNO_3$ (mg in 5 ccm)	K· Kaliumgehalt in 5 ccm (mg)	Cl′	K·	Cl′	K·
1						
2	5,00 (17,73)	—	—		—	—
3				0,0071		
4	5,10 (18,08)	Spur	—		—	—
5				0,0298		
6						
7	5,20 (18,44)	0,0195	—	0,0646	-	—
8						
9		0,0419	—		—	—
10						
11	5,30 (18,79)	0,0496	—		—	—

Der direkte Versuch über die Permeabilität für Anionen gestaltet sich etwas schwieriger. Eigentlich ist der Beweis für die Impermeabilität für Anionen schon gegeben, denn sonst wäre der Unterschied in der Permeabilität des Kaliums bei der Diffusion gegen reines Wasser und gegen eine Na-Salzlösung unverständlich. Immerhin versuchten wir diesen Beweis direkt zu führen. Die technischen Schwierigkeiten sind hier viel größer als bei den Kationen. Der Apfelsaft enthält, wie es scheint, keine Anionenart in größerer Konzentration, welche einer leichten Mikroanalyse zugänglich ist. So ist z. B. Chlor nur in Spuren im Apfelsaft vorhanden, und die Anionen der organischen Säuren des Apfels sind für eine Mikroanalyse nicht gerade geeignet. Wir wählen deshalb den umgekehrten Weg und versuchten zu prüfen, ob ein in Wasser gelöstes Anion, welches im Apfelsaft nicht vorkommt, bei der Diffusion allmählich in den Apfel hinein verschwindet. Solche Versuche wurden mit $NaJO_3$ und KJO_3 angestellt. Versuche mit verhältnismäßig hohen Konzentrationen an KJO_3 (n/100) konnten uns zunächst nur über die Verläßlichkeit der Methode Auskunft geben (Tabelle III A). Die Versuche mit K hatten uns ja gelehrt, daß nur sehr kleine Mengen selbst nach zwei Wochen diffundieren. Der Versuch mit n/100 KJO_3 mußte also praktisch Gleichheit der Jodatkonzentration auch nach langer Diffusionszeit ergeben. Dies hat sich in dem Versuch Tabelle III A bestätigt, auch nach 13 tägiger Diffusion ist die Konzentration des Jodats noch unverändert. Die wichtigeren Versuche sind die mit noch verdünnterer Jodatlösung (0,001 n und 0,0002 n). (Tabelle III B, C, D).

In diesen Versuchen hätte man den Verlust von K-Jodat sicher feststellen können, wenn ebensoviel Jodationen in den Apfel hineindiffundiert wären, wie in den Versuchen von K-Ionen aus dem Apfel

Tabelle 11.

	A				B			
	n/10 Na Cl		n/10 Na-Acetat	Aqua dest.	n/10 Na Cl		n/10 Na-Acetat	Aqua dest.
Volumen des Apfels .	275 ccm		253 ccm	169 ccm	169 ccm		159 ccm	182 ccm
Gewicht des Apfels . .	198,1472 g		184,485 g	221,0289 g	130,9703 g		121,7235 g	136,6704 g
Volumen der zugesetzten Lösung	250 ccm		250 ccm	300 ccm	160 ccm		160 ccm	160 ccm
Zeitdauer d. Eintauchens in Tagen	Cl' ccm von n/10 $AgNO_3$ in 5 ccm Lösung (mg in 5 ccm)	K˙ mg in 5 ccm	K˙ mg in 5 ccm	K mg in 5 ccm	Cl' ccm von n/10 $AgNO_3$ in 5 ccm Lösung (mg in 5 ccm)	K˙ mg in 5 ccm	K' mg in 5 ccm	K'' mg in 5 ccm
1					5,00 (17,73)	—	—	—
2	5,00 (17,73)	Spur	—	—				
3					5,00 (17,73)	Spur	Spur	—
4	5,00 (17,73)	Spur	Spur	—				
5					5,02 (17,80)	0,0110	0,0110	—
6	5,00 (17,73)	0,00568	Spur	—				
7					5,03 (17,84)	0,0326	0,0568	—
8	5,00 (17,73)	0,0775	0,00284	—				
9					5,03 (17,84)	0,0802	0,1240	—
10	5,00 (17,73)	0,0970	0,0163	—				
11					5,04 (17,87)	0,1245	0,1415	Spur
12	5,00 (17,73)	0,2040	0,0277	Spur				
13						0,1355	0,1840	Spur
14								
15					5,07 (17,98)	0,1540	0,2255	0,0064
16	5,05? (17,91)	0,2460	0,0628	0,00355				
17					5,05 (17,91)	0,1633	0,2680	0,0096
18	4,93 (17,48)	0,3765	0,0646	0,0046				
Gewicht d. Apfels nach 19 tägigem Eintauchen	198,8189		185,0078	220,9605	132,4300		123,0502	138,8540

Tabelle II C.

Zeitdauer des Eintauchens in Tagen	n/10 NaCl		n/10 Na-Acetat		Aqua dest.	
	Cl′ 5 ccm Lösung entsprechende ccm n/10 $AgNO_3$ (mg in 5 ccm)	K˙ Kaliumgehalt in 5 ccm (mg)	Cl′	K˙	Cl′	K˙
1						
2	5,00 (17,73)	—	—		—	—
3				0,0071		
4	5,10 (18,08)	Spur	—		—	—
5				0,0298		
6						
7	5,20 (18,44)	0,0195	—	0,0646	-	—
8						
9		0,0419	—		—	—
10						
11	5,30 (18,79)	0,0496	—		—	—

Der direkte Versuch über die Permeabilität für Anionen gestaltet sich etwas schwieriger. Eigentlich ist der Beweis für die Impermeabilität für Anionen schon gegeben, denn sonst wäre der Unterschied in der Permeabilität des Kaliums bei der Diffusion gegen reines Wasser und gegen eine Na-Salzlösung unverständlich. Immerhin versuchten wir diesen Beweis direkt zu führen. Die technischen Schwierigkeiten sind hier viel größer als bei den Kationen. Der Apfelsaft enthält, wie es scheint, keine Anionenart in größerer Konzentration, welche einer leichten Mikroanalyse zugänglich ist. So ist z. B. Chlor nur in Spuren im Apfelsaft vorhanden, und die Anionen der organischen Säuren des Apfels sind für eine Mikroanalyse nicht gerade geeignet. Wir wählen deshalb den umgekehrten Weg und versuchten zu prüfen, ob ein in Wasser gelöstes Anion, welches im Apfelsaft nicht vorkommt, bei der Diffusion allmählich in den Apfel hinein verschwindet. Solche Versuche wurden mit $NaJO_3$ und KJO_3 angestellt. Versuche mit verhältnismäßig hohen Konzentrationen an KJO_3 (n/100) konnten uns zunächst nur über die Verläßlichkeit der Methode Auskunft geben (Tabelle III A). Die Versuche mit K hatten uns ja gelehrt, daß nur sehr kleine Mengen selbst nach zwei Wochen diffundieren. Der Versuch mit n/100 KJO_3 mußte also praktisch Gleichheit der Jodatkonzentration auch nach langer Diffusionszeit ergeben. Dies hat sich in dem Versuch Tabelle III A bestätigt, auch nach 13 tägiger Diffusion ist die Konzentration des Jodats noch unverändert. Die wichtigeren Versuche sind die mit noch verdünnterer Jodatlösung (0,001 n und 0,0002 n). (Tabelle III B, C, D).

In diesen Versuchen hätte man den Verlust von K-Jodat sicher feststellen können, wenn ebensoviel Jodationen in den Apfel hineindiffundiert wären, wie in den Versuchen von K-Ionen aus dem Apfel

Tabelle III.

	A			B		
	n/100 KJO_3			n/1000 KJO_3		
	eingetaucht mit Apfel I	eingetaucht mit Apfel II	ohne Apfel	eingetaucht mit Apfel I	eingetaucht mit Apfel II	ohne Apfel
Volumen d. Apfels	182 ccm	182 ccm		174 ccm	170 ccm	
Gewicht d. Apfels				142,1954 g	151,6466 g	
Volumen der zugesetzten Lösung	160 ccm	160 ccm		170 ccm	170 ccm	
Zeit der Analyse in Tagen nach der Ansetzung	JO_3'. ccm n/20 Thiosulfat (mg JO_3' in 5 ccm)			JO_3' ccm n/200 Thiosulfat (mg JO_3' in 5 ccm)		
1			6,00 (8,75)	6,00 (0,875)	6,00 (0,875)	6,00 (0,875)
2						
3	6,04 (8,80)	6,00 (8,75)		6,05 (0,882)	6,10 (0,889)	6,00 (0,875)
4						
5	6,05 (8,82)	6,10 (8,89)		6,05 (0,882)	6,10 (0,889)	6,00 (0,875)
6						
7	6,10 (8,89)	6,06 (8,83)		6,05 (0,882)	6,15 (0,896)	6,00 (0,875)
8						
9	6,10 (8,89)	6,05 (8,82)		6,05 (0,882)	6,15 (0,896)	6,00 (0,875)
10						
11	6,10 (8,89)	6,05 (8,82)				
12				6,10 (0,889)	6,05 (0,882)	6,00 (0,875)
13	6,05 (8,82)	6,05 (8,82)				
14						
15	6,20 (9,05) Schimmel	6,10 (8,89) Schimme		6,10 (0,889) Verfärbung der Schale	5,75 (0,838) Verfärbung d. größten Teiles der Schale	6,00 (0,875)
16						
17						
18	6,10 (8,89) reichlicher Schimmel	6,00 (8,75) reichlicher Schimmel		6,10 (0,889) Verfärbung fast ebenso	5,10 (0,744) Verfärbung etwas vermehrt	6,00 (0,875)
Gewicht d. Apfels nach Eintauchen	145,3470	141,5679		144,7176	155,7318	

herausdiffundiert waren. Der Versuch ergab aber keine Abnahme der Jodationen.

Es ist somit der experimentelle Beweis erbracht, daß aus dem Apfel gegen reines Wasser kein Kalium diffundiert. Da nun das Kalium das überwiegende Kation des Apfelsaftes ist, ist der Schluß gerechtfertigt, daß aus dem Apfel gegen reines Wasser überhaupt kein Elektrolyt innerhalb 2 Wochen herausdiffundiert. Andererseits ist experi-

Tabelle III.

	C			D		
	Etwa 0,001 n $NaJO_3$			Etwa 0,0002 n KJO_3		
	eingetaucht mit Apfel I	eingetaucht mit Apfel II	ohne Apfel	eingetaucht mit Apfel I	eingetaucht mit Apfel II	ohne Apfel
Volumen d. Apfels	168 ccm	187 ccm				
Gewicht d. Apfels	133,1211 g	141,7173 g				
Volumen der zugesetzten Lösung	170 ccm	170 ccm				
Zeit der Analyse in Tagen nach der Ansetzung	JO_3' ccm n/200 Thiosulfat (mg in 5 ccm)			JO_3' ccm n/200 Thiosulfat (mg in 10 ccm)		
1	5,80 (0,845)	5,80 (0,845)	5,80 (0,845)			
2						
3	5,80 (0,845)	5,80 (0,845)	5,75 (0,838)			
4						
5	5,90 (0,860)	5,80 (0,845)	5,75 (0,838)	2,455 (0,358)	2,445 (0,357)	2,450 (0,357)
6						
7				2,540 (0,370)	2,445 (0,357)	2,445 (0,357)
8	5,90 (0,860)	5,85 (0,853)	5,75 (0,838)			
9						
10				2,535 (0,370)	2,435 (0,355)	2,440 (0,356)
11	5,95 (0,867)	5,85 (0,853)	5,75 (0,838)			
12				2,540 (0,370)	2,510 (0,366)	2,450 (0,357)
13						
14	5,90 (0,860)	5,80 (0,845)	5,75 (0,838)	2,540 (0,370)	2,495 (0,363)	2,450 (0,357)
15						
16	5,92 (0,862)	5,95 (0,868)	5,80 (0,845)			
17						
18	5,90 (0,860)	5,90 (0,860)				
Gewicht d. Apfels nach Eintauchen	137,6092	145,810		104,409	112,840	

mentell der Beweis erbracht, daß Kaliumionen aus dem Apfel herausdiffundieren, wenn sie gegen ein anderes Kation, Natrium, ausgetauscht werden können. Ferner konnte gezeigt werden, daß ein Hineindiffundieren eines fremden Anions in den Apfel jedenfalls nicht analytisch nachgewiesen werden kann.

Wir haben somit eine Membran, welche für K-Ionen durchlässig und für Jodationen undurchlässig ist. Daraus folgt, daß bei der Berührung von KJO_3-Lösung mit der Apfelschale eine elektrische Potentialdifferenz entstehen muß, welche von der Konzentration des KJO_3 abhängt. Nun zeigt aber der Versuch, daß eine Potentialdifferenz

von gleicher Größe und Art nicht nur durch KJO_3, sondern auch durch andere Salze entsteht. Das KJO_3 zeigt bei der Potentialbildung keine Ausnahmestellung. Wir dürfen daraus schließen, daß die aus technischen Gründen auf das K-Ion beschränkten Versuche auch für andere Kationen zutreffen, und daß die Versuche mit Jodationen auch für andere Anionen gültig sind.

Es wird auffällig erscheinen, daß man selbst in den günstigsten Fällen viele Tage braucht, um die Diffusion eines Ions nachzuweisen, während die Potentialdifferenz der Apfelschale bei der Berührung mit einer Salzlösung sich in wenigen Minuten ziemlich konstant einstellt. Man könnte meinen, daß die zeitliche Differenz darauf hinweist, daß die beiden Erscheinungen nicht miteinander zusammenhängen. Diese Ansicht wäre aber nicht berechtigt, denn für die Einstellung des Potentials genügt es, daß z. B. einige K-Ionen bis zu einer Tiefe von einigen Atomdurchmessern in den Apfel eindringen, während für einen Diffusionsversuch die Durchwanderung durch die ganze Dicke der Schale erforderlich ist. Da selbst bei günstigsten Bedingungen die überhaupt erreichbare Konzentration des Kaliums in der wachsartigen Apfelschale nur minimal sein kann, kann auch der Diffusionsdruck gegen die Außenlösung immer nur minimal sein. Die Kleinheit des Diffusionsdrucks bewirkt, daß die Diffusionsversuche sehr lange Zeit ausgedehnt werden müssen, aber sie hat keinen großen Einfluß auf die Schnelligkeit, mit der sich das Potential einstellt.

Auf Grund der Potentialmessungen schien uns die Annahme notwendig, daß die Apfelschale für beliebige Kationen permeabel, für beliebige Anionen impermeabel sei. Wir betrachten es als den wesentlichen Inhalt dieser Arbeit, diese Behauptung wenigstens für ein geeignetes Kation und ein geeignetes Anion im direkten Diffusionsversuch experimentell nachgewiesen zu haben. Besonders lehrreich ist die Langsamkeit der Diffusion selbst bei dem als diffusibles Ion zu betrachtenden K. Die Dicke des Diffusionsweges ist zwar viel größer als bei der sehr feinen Membran eines Blutkörperchens. Aber immerhin beträgt die Dicke der wachsartigen Membran des Apfels nur einen kleinen Bruchteil eines Millimeters, wie man sich durch das Mikroskop leicht überzeugen kann, und doch haben wir in diesem wachsartigen Überzug die wirksame Membran zu erblicken, denn künstliche, aus einem Ligroinextrakt der Apfelschale hergestellte Membranen sind elektrometrisch ähnlich, wenn auch nicht ganz so stark wirksam wie die natürliche Apfelschale, was wir in dieser Mitteilung nur vorläufig erwähnen wollen. Jedenfalls sehen wir aus diesen Versuchen, daß kurzdauernde Diffusionszeiten von etwa einem Tage uns zu falschen Vorstellungen führen würden, und bei Blutkörperchen sind ja die längeren Diffusionszeiten kaum anwendbar. Zur Erforschung der prinzipiellen

Verhältnisse müssen so resistente Membranen wie die Apfelschale zunächst bevorzugt werden. Solche Versuche dürften bei kritischer Verwertung auch einen Einfluß gewinnen auf die offenbar viel komplizierteren Verhältnisse an den zarteren Zellmembranen.

Zusammenfassung.

Wenn man einen Apfel mit intakter Schale in reines Wasser legt, so läßt sich auch nach 2 Wochen ein Austritt von K aus dem Apfel durch seine Membran hindurch in das Wasser nicht nachweisen. Läßt man aber den Apfel in der Lösung eines Na-Salzes, so wird langsam aber deutlich das Na durch K ausgetauscht. Der Durchtritt eines Anions durch die Apfelschale läßt sich bisher überhaupt nicht nachweisen. Die Apfelschale kann daher als eine für Kationen permeable, für Anionen impermeable Membran aufgefaßt werden.

Über das Wesen der Autolyse.

III. Mitteilung:

Zur Charakteristik des autolytischen Prozesses im Leberbrei.

Von

O. Steppuhn und **Xenia Utkin-Ljubowzow.**

(Aus der Abteilung für experimentelle Pathologie und Pharmakologie des Staatlichen Chemo-pharmazeutischen Forschungsinstituts zu Moskau.)

(Eingegangen am 11. Februar 1925.)

In unserer vorigen Mitteilung[1]) äußerten wir bereits die Meinung, daß ein erst bei ausgesprochen saurer Reaktion des Mediums arbeitendes proteolytisches Ferment der Organe für den Eiweißhaushalt der normalen Zelle kaum von Bedeutung sein dürfte. Dieses schließt aber gar nicht die Möglichkeit aus, daß es Zustände geben *kann*, die zu einer richtigen invivo-Autolyse führen — damit wäre der Übergang zum Tode der Zelle gegeben, wo durch zügellosen Kohlehydrat- und Fettzerfall und andere Prozesse mehr eine derartige Säuerung erreicht wäre, daß eine Pepsinase optimal walten könnte —, gerade dann würde ja auch ein Wegräumen der sich ansammelnden Spaltprodukte durch Schädigung der Zellgrenzschicht und freie Filtration oder Diffusion eintreten müssen. Damit soll nur ganz kurz angedeutet werden, daß der Sinn einer Pepsinase der Zelle mit einem physiologisch undenkbaren Optimum (nahe an $p_H = 3$) in Krankheit und hauptsächlich im Tode der Zelle zu suchen ist. Es ist eben sinnreich und verständlich, daß eine Zelle zu Lebzeiten *in sich selbst* Vorrichtungen trägt, um nach ihrem Tode ihre Substanz auf alle Fälle verwendungsfähig zu machen. Eiweißspaltende Bakterien als Vermittler sind zufällige Herkömmlinge.

Diese übrigens noch ganz unbewiesene Anschauung setzt aber die Existenz anderer proteolytischer Fermente in Organzellen voraus, die ihre günstigen Arbeitsbedingungen bei der beinahe neutralen Zellreaktion besitzt. Es sind ja auch tatsächlich solche Fermente — Tryptasen und Peptasen — von vielen Forschern (*Hedin*, *Dernby*, *Abder-*

---

[1]) *O. Steppuhn* und *L. Utkin-Ljubowzow*, diese Zeitschr. **150**, 165, 1924.

halden u. a.) angenommen werden. Die Versuche von *Rona* und *Mislowitzer*[1]), die nur eine Pepsinase im Leberbreiautolysat aufgefunden haben, sprechen dagegen. Nun wiesen wir bereits darauf hin (l. c.), daß das Autolysat in den Versuchen genannter Forscher, Blut, also sicher auch Tryptasen, andererseits aber auch Antitrypsin enthielt. Es ist bekannt[2]), daß Serum auch die Organproteolyse hemmt, es ist auch festgestellt worden, daß Organpreßsäfte antitryptische Eigenschaften besitzen[3]). Es ist selbstverständlich, daß in einem so unentwirrbaren Gemisch, wie ein bluthaltiges Organautolysat, die tryptische Phase des Prozesses verdeckt werden kann und sich nur die zügellose Arbeit einer Pepsinase offenbart.

Es schien uns von Wichtigkeit, andersartige Versuche anzustellen, um Klarheit darüber zu gewinnen, ob nur ein Ferment (Pepsinase), oder zwei, oder gar mehr charakteristische Fermente am Autolyseprozeß teilnehmen.

Zwei Wege schienen uns gangbar; einmal könnte man versuchen, so oder anders das Substrat vom Fermentgemisch zu trennen und dann demselben ein anderes wohlcharakterisiertes Substrat vorzulegen. Dadurch wären übersichtliche Verhältnisse gewonnen und die Differenzierung der Fermentgruppen möglich. Diesbezügliche Versuche mit Anwendung des Germanins (Bayer 205), welches die merkwürdige Eigenschaft besitzt, Eiweißkomplexe zu binden, ohne die Fermente (wenigstens qualitativ) zu beeinträchtigen, brachten vorläufig wenig Glück, dagegen ist es auf andere Art gelungen, worüber die nächste Mitteilung handelt.

Eine andere Möglichkeit, wenigstens qualitativ verschiedene Fermente im Autolysat zu fassen, erwuchs aus folgenden Betrachtungen. Wird z. B. ein Leberbrei einer freiwilligen Autolyse überlassen, so ändert sich der Zustand und die Zusammensetzung des Reaktionsmediums wesentlich. Es verschiebt sich die Wasserstoffionenkonzentration, größere Kolloidkomplexe werden gespalten, Adsorptionsbedingungen zwischen Ferment und Substrat werden durch Anhäufung der Spaltstücke verändert, es tritt dadurch bedingt ein sogenanntes „falsches Gleichgewicht“ ein. Besonders ist es hervorzuheben, daß ein eventuell vorhandenes Antitrypsin, ob Stoff oder Zustand, während der Autolyse seine spezifischen Eigenschaften einbüßen kann. Sollte nun im Autolysat nur ein Ferment wirksam sein, dann müßten sich die Bedingungen für die Arbeit dieses Ferments während der Autolyse in irgend einer Richtung verändern, aber *gleichsinnig* in welchem

[1]) Diese Zeitschr. **140**, 517, 1923.
[2]) *Baer* und *Loeb*, Arch. f. exper. Pathol. **53**, 1, 1905.
[3]) *Rosemann*, Klin. Wochenschr. 1923; diese Zeitschr. **129**, 101.

Reaktionsmedium, was Wasserstoffionenkonzentration anbetrifft, vorausgesetzt, daß das Ferment in diesem Medium überhaupt noch arbeitet. Läßt man also ein Autolysat längere Zeit stehen, hemmt den gar rapiden Prozeß durch geeignete Temperatur und entnimmt dem Gemisch von Zeit zu Zeit Proben, um dann bei ganz bestimmten und gleichen Bedingungen die Autolyse im Verlauf einer kurzen Zeit bei nur verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen zu studieren, so muß, wenn nur ein Ferment vorliegen würde, die Veränderung der fermentativen Kraft sich gleichsinnig für beide Punkte derselben Reaktionskurve verändern. Tritt dieses nicht ein, verändert sich also der Reaktionsverlauf der Autolyse desselben Materials zu verschiedenen Zeitpunkten bei verschiedenem p_H nicht gleichsinnig, so ist der monofermentative Charakter der Autolyse zum mindesten verdächtig.

Zu unseren Versuchen wählten wir zwei Puffer: $p_H = 3{,}8$ (das Optimum der Pepsinase nach *Rona* und *Mislowitzer*, l. c.) und $p_H = 7$, das ist die praktisch neutrale Reaktion, bei welcher nach Angaben genannter Forscher die Pepsinase noch arbeitet und bei welcher einer eventuell vorhandenen, an die neutralen Körpersäfte „gewöhnten" Tryptase Arbeitsgelegenheit geboten wäre.

Im einzelnen gestalteten sich unsere Versuche folgendermaßen: Die mit physiologischer Kochsalzlösung von den Gefäßen aus gründlich durchgespülte Kaninchenleber wurde aufs feinste im Mörser verrieben und durch Verbandgaze gedrückt. Der Brei wurde zu 10 Proz. in destilliertem Wasser aufgeschwemmt und unter Toluolschutz bei Zimmertemperatur der Autolyse überlassen. Zu verschiedenen Zeitintervallen wurden dem Autolysat Proben entnommen und der Verlauf des Prozesses bei verschiedenen p_H durch Reststickstoffbestimmungen gemessen. Dazu wurden in kleine Kölbchen je 5 ccm der Aufschwemmung, 5 ccm des entsprechenden Puffergemisches und 5 ccm Wasser eingetragen. In dem einen Kölbchen wurden die Proteine sofort koaguliert, um den anfänglichen Rest-N-Wert zu bestimmen. Die anderen Proben wurden bei 37° C unter Toluol und Thymolschutz der weiteren Autolyse im Verlauf von zweimal 24 Stunden überlassen. Danach wurden die Proteine (Ferrum oxyd. dialysatum + Kaliumsulfat) gefällt, die Flüssigkeit auf ein bestimmtes Volumen gebracht, filtriert und im Filtrat der Reststickstoff bestimmt.

Als Pufferung benutzten wir ein Phosphatgemisch für $p_H = 7$ und ein Acetatgemisch für $p_H = 3{,}8$. Es wurde die Wasserstoffionenkonzentration nicht jedesmal elektrometrisch gemessen, viele Kontrollen zeigten uns, daß Schwankungen zwischen bestimmtem und berechnetem $p_H - 0{,}1$ kaum übersteigen — ein Fehler, der in unserem Falle gar nicht ins Gewicht fallen kann.

Die entsprechenden Versuche sind in den Tabellen I bis III wiedergegeben. In den Spalten „Proteinzerfall Proz." ist berechnet, wie viel Prozente von dem zur Verfügung stehenden Proteinstickstoff angegriffen und in Rest-N übergeführt worden sind. Die Berechnung ging von der Differenz zwischen dem jeweils bestimmten anfänglichen Gesamt-N und Rest-N aus, diese wurde zum Rest-N-Zuwachs in Verhältnis gesetzt.

Tabelle I.

Gesamt-N in 5 ccm Leberaufschwemmung = 8,82 mg. Dauer 2 × 24 Stunden.

Probeentnahme:	Sofort		Nach 3 × 24 Std.		Nach 7 × 24 Std.		Nach 22 × 24 Std.	
Versuchsbedingungen	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall mg	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.
Vor d. Versuch	0,74	—	1,54	—	1,89	—	1,90	—
Leber $p_H = 3,8$	5,88	63,7	5,32	52,0	3,92	29,3	3,08	17,1
Leber $p_H = 7$	1,12	4,7	2,24	9,6	2,38	7,1	1,89	0

Tabelle II.

Gesamt-N in 5 ccm Leberaufschwemmung = 11,83 mg. Dauer 2 × 24 Stunden.

Probeentnahme:	Sofort		Nach 5 × 24 Std.		Nach 10 × 24 Std.	
Versuchsbedingungen	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.
Vor d. Versuch	1,15	—	1,47	—	1,82	—
Leber $p_H = 3,8$	6,16	46,8	4,85	32,6	3,22	13,9
Leber $p_H = 7$	1,29	1,3	1,89	4,1	2,03	2,1

Tabelle III.

Gesamt-N in 5 ccm Leberaufschwemmung = 9,8 mg. Dauer 2 × 24 Stunden.

Probeentnahme:	Sofort		Nach 5 × 24 Std.		Nach 11 × 24 Std.		Nach 21 × 24 Std.	
Versuchsbedingungen	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.
Vor d. Versuch	1,59	—	2,59	—	2,90	—	2,92	—
Leber $p_H = 3,8$	7,30	70,0	6,27	51,0	5,54	38,3	4,55	27,3
Leber $p_H = 7$	2,12	6,5	2,90	4,3	3,35	6,5	2,87	0

Schon die flüchtige Betrachtung der Tabellen läßt vor allen Dingen eine Gesetzmäßigkeit erscheinen: es verändert sich die Proteinspaltung im sauren und neutralen Puffer nicht gleichsinnig. Im sauren Puffer klingt das autolytische Vermögen des Autolysats von Versuch zu Versuch ab; im Puffer $p_H = 7$ treten Schwankungen des proteolytischen Vermögens auf, wobei in allen Versuchen *ein Stadium einer Verstärkung der Proteolyse eintritt.*

Diese Verstärkung ist im ersten Versuch (Tabelle I) schon am dritten Tage gefaßt worden, im zweiten Versuch am fünften Tage, im dritten Versuch am elften Tage. Der dritte Versuch weicht dadurch ab, daß vom ersten bis zum fünften Tage eine Verminderung der Proteolyse eintritt, um dann zum elften Tage das anfängliche Niveau zu erreichen. Es klingt insgesamt selbstverständlich beim Fortschreiten der Proteolyse auch die Spaltbarkeit von Protein im neutralen Puffer ab, der Verlauf des Reaktionsganges ist aber nicht nur quantitativ,

sondern auch qualitativ ein ganz anderer. Wäre im Gemisch nur ein Ferment vorhanden, dann mußten wir einen, wenn auch nur ungefähr parallelen Verlauf erwarten. In jedem Medium müßte das Ferment in Abhängigkeit vom Fortschreiten der Autoproteolyse — also Aufbrauch des Ferments — eine gleichsinnige und annähernd proportionale Abnahme der Spaltfähigkeit erfahren. Die Spaltung im neutralen Puffer ist gering, sie verdoppelt sich aber am dritten Tage, gegenüber der Nullzeit („sofort") in Tabelle I und verdreifacht sich in Tabelle II am fünften Tage gegenüber der Nullzeit. Es scheint, daß dieses alles zur Annahme berechtigt, daß im Gemisch kaum nur ein Ferment vorliegen kann — dieses schließt natürlich nicht aus, daß im neutralen Puffer die Pepsinase (*Rona* und *Mislowitzer*, l. c.), wenn sie es kann. noch mitarbeitet. Nimmt man die Existenz von mindestens zwei Fermenten im Autolysat an, von denen das eine sein Optimum im sauren Medium haben mag, das andere aber sicher, entsprechend den Aufgaben der Zelle, mit einer dem neutralen Punkte nahen Reaktion des Mediums bei der neutralen Reaktion seine uneingeschränkte Tätigkeit zu offenbaren imstande sein muß — nur gehemmt durch spezielle und notwendige Regulationsmechanismen (eventuell Antitrypsin) —. so wird sich die biologische Seite der Frage entschieden klären. Wir haben schon in unserer vorigen Mitteilung (l. c.) ausgeführt, daß die Zelle zu nimmer aufhörenden und manchmal ganz beträchtlichen Eiweißumsätzen, nicht zu den günstigen Bedingungen der Pepsinasearbeit ($p_H = 3{,}6$ bis $3{,}8$) greifen kann.

Es mag erwähnt werden, daß die Betrachtung der Tabellen I und III noch folgendes ergibt. Im ersten Falle bleibt die Autolyse schon am siebenten Tage stehen, im zweiten Falle, am elften Tage: die Rest-N-Werte bleiben am 22. bzw. 21. Tage die gleichen. Dieses gilt aber nur für die natürliche Reaktion des Autolysats, welches nach unseren Messungen, übereinstimmend mit *Sevringhaus*[1]), $p_H =$ etwa $6{,}0$ nicht übersteigt, läßt man aber das Autolysat dann bei $p_H = 3{,}8$ arbeiten. dann tritt sofort eine Weiterspaltung ein.

Beim Überführen des Autolysats am siebenten Tage (Versuch I) und am elften Tage (Versuch 3) in ein neutrales Medium tritt aber auch eine bedeutende Spaltung ein, trotzdem, daß die Autolyse bei $p_H =$ etwa 6 stillstand, dieses läßt auch daran denken, daß wir für ein eventuell vorhandenes tryptisches Ferment des Autolysats durch Wechsel von $p_H = 6$ auf $p_H = 7$ die Arbeitsbedingungen verbessern.

Am 22. bzw. 21. Tage ist die Autolyse bei $p_H = 3{,}8$ noch nicht erschöpft, dagegen bleiben bei $p_H = 7$ die Anfangsrestwerte und die nach 2×24stündiger Autolyse dieselben.

[1]) *Sevringhaus*, *Koehler* und *Bradley*, Journ. of biol. Chem. 57, 163, 1923.

Ganz die gleichen Versuche haben wir mit einigen Abänderungen und Ergänzungen wiederholt. Anstatt das Autolysat bei Zimmertemperatur aufzubewahren, haben wir es in den Thermostaten gesetzt, dafür mußte die Zeit verkürzt werden; die letzte Probeentnahme fand nach 134 bzw. 95 Stunden statt, und nur im letzten Versuch (Tabelle VI) wurde sie auf 240 Stunden ausgedehnt. Auch wurden noch Reihen mit Casein als ergänzendes Substrat angesetzt, da dieses, wie bekannt, noch dann angegriffen wird, wenn, wie in Serum z. B., das Eigenprotein fermentfest ist.

Die Versuchsanordnung war genau wie beschrieben, das Casein wurde in 1proz. Lösung à 5 ccm in die einzelnen Kölbchen eingetragen. Da die Caseinlösungen nicht haltbar sind, so wurden sie jedesmal frisch zubereitet und ihr N-Wert jedesmal bestimmt, er schwankte für die 5 ccm Lösung zwischen 6,4 bis 7,0 mg. Entsprechend wurde auch der Rest-N für das Gemisch „Leber + Casein" jeweils vor dem Versuch bestimmt. Die Versuche sind durch die Tabellen IV und V illustriert.

Auch diese Versuche bestätigen im großen und ganzen unsere oben gemachte Annahme. Es liegt selbstverständlich nicht in unserer Hand, für jeden Versuch solche Zeitintervalle zu wählen, daß wir auf den beobachteten Anstieg der Autoproteolyse im neutralen Puffer stoßen. Immerhin ist ein solcher Anstieg in Tabelle V deutlich zum Vorschein gekommen, von der 43. zur 67. Stunde steigt der Proteinzerfall von 3,1 auf 8,0 Proz. und weiter sogar auf 13,8 Proz. (95. Stunde). Im sauren Puffer ist auch hier in beiden Versuchen ein kontinuierlicher Abfall der Lyse zu beobachten.

Auffallend in diesen Versuchen ist auch die Verteilung des Angriffs im sauren und neutralen Medium auf das Eigenprotein und das Autolysat mit Caseinzusatz, was auch daran denken läßt, daß hier nicht ein Ferment vorliegen kann (Tabelle VI). In der Spalte $p_H = 3{,}8$, die sich auf Tabelle IV bezieht, sieht man ein geringes Anwachsen der Verhältniszahl, die übrigens für 86 und 134 Stunden auf demselben Niveau bleibt, in *demselben* Zeitintervall steigt die Zahl für $p_H = 7{,}1$ von 3,05 auf 8,0. Betrachtet man die Tabelle IV, so sieht man, daß die Eigenproteinspaltung bei $p_H = 7{,}1$ zum Schluß erschöpft ist, setzt man aber Casein hinzu, so wird weiter gespalten, entweder weil das Ferment nur gegen Eigeneiweiß erschöpft war, oder weil eine Tryptase erschöpft ist, aber nicht eine Peptase, die ja auch Casein spalten könnte. Diese Frage ist durch vorliegende Versuche nicht entscheidbar.

In den entsprechenden Kolumnen der Tabelle VI, die sich auf Tabelle V beziehen, sieht man, daß die Verhältniszahlen für $p_H = 3{,}8$ annähernd konstant bleiben, für $p_H = 7{,}1$ ist ein gewaltiger Anstieg und dann ein Abfall zu beobachten.

Tabelle IV.

Gesamt-N in 5 ccm Leberaufschwemmung = 10,53 mg. Dauer 2 × 24 Stunden.

Probeentnahme:	Sofort		Nach 18 Std.		Nach 42 Std.		Nach 86 Std.		Nach 134 Std.	
Versuchsbedingungen	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.
Leber vor dem Versuch	1,12	—	2,38	—	2,67	—	2,87	—	3,01	—
Leber + Casein vor dem Versuch	1,40	—	2,66	—	2,95	—	3,22	—	3,22	—
Leber $p_H = 3,8$	6,45	56,4	4,56	26,7	3,85	15,0	3,71	10,9	3,64	8,4
„ $p_H = 3,8$ + Casein	11,45	62,7	8,15	38,5	7,10	29,6	6,44	23,5	5,67	17,9
„ $p_H = 7,1$	1,89	8,2	2,95	7,0	3,02	4,5	3,15	3,7	3,08	0,9
„ $p_H = 7,1$ + Casein	4,50	19,4	4,70	14,3	4,90	13,9	4,76	11,3	4,20	7,2

Tabelle V.

Gesamt-N in 5 ccm Leberaufschwemmung = 11,62 mg. Dauer 2 × 24 Stunden.

Probeentnahme:	Sofort		Nach 19 Std.		Nach 43 Std.		Nach 67 Std.		Nach 95 Std	
Versuchsbedingungen	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.	Rest-N mg	Proteinzerfall Proz.
Leber vor dem Versuch	1,11	—	5,76	—	7,07	—	7,00	—	7,07	—
Leber + Casein vor dem Versuch	1,74	—	6,46	—	7,42	—	7,30	—	7,70	—
Leber $p_H = 3,8$ . . .	7,00	56,0	8,00	38,3	7,98	20,0	8,00	21,7	7,84	16,9
„ $p_H = 3,8$ + Casein	13,10	67,6	12,20	49,7	11,42	35,7	11,33	37,0	10,15	21,9
„ $p_H = 7,1$	1,96	8,1	6,11	6,0	7,21	3,1	7,37	8,0	7,70	13,8
„ $p_H = 7,1$ + Casein	5,75	23,8	9,55	27,0	10,57	28,1	9,82	23,2	8,89	11,1

Tabelle VI.
Verhältniszahlen der Verdauung von Casein + Eigenprotein zur Verdauung von Eigenprotein bei $p_H = 3,8$ und $p_H = 7,1$.

Zu Tabelle IV			Zu Tabelle V		
Stunden	$p_H = 3,8$	$p_H = 7,1$	Stunden	$p_H = 3,8$	$p_H = 7,1$
0	1,11	2,37	0	1,20	2,94
18	1,44	2,05	19	1,29	4,50
42	1,97	3,10	43	1,78	9,10
86	2,15	3,05	67	1,71	2,90
134	2,13	8,00	95	1,30	0,80

Wenn wir das oben Gesagte kurz summieren, so müssen wir sagen, daß unsere Versuche gegen die Existenz nur eines Ferments im Autolysat sprechen, denn 1. im Verlauf der Autolyse wird die Spaltfähigkeit wie des Eigenproteins, so auch mit Caseinzusatz im sauren und neutralen Puffer nicht gleichsinnig verändert (abgeschwächt); 2. im neutralen Puffer tritt zum Unterschied vom sauren Puffer regelmäßig (mit einer Ausnahme) ein Stadium der Verstärkung der Eigeneiweißspaltung ein; 3. ist das Verhältnis von Eigenprotein + Caseinspaltung zu Eigeneiweißspaltung im sauren Puffer annähernd konstant, im neutralen Puffer ganz inkonstant, jedenfalls gehen die Verhältniszahlen in denselben Zeitintervallen vollständig auseinander.

Im Zusammenhang mit den angeführten Versuchen, insbesondere der Tatsache, daß im neutralen Puffer die Autolyse nach einigen Tagen eine Verbesserung erfährt, stellten wir uns die Frage nach der Ursache dieser Erscheinung. Vor allen Dingen mußte daran gedacht werden, daß das gesetzmäßige Abfallen der Autolyse im sauren Puffer gerade deswegen gesetzmäßig, weil ungehindert, verläuft. Für die Arbeit des Ferments mit saurem Optimum — für eine Pepsinase also — brauchen keine Schranken, keine Regulationsmechanismen zu existieren, eben weil der Prozeß kein physiologischer ist und weil, wenn er überhaupt in vivo eintritt, dieses eine katastrophale Gefährdung und Übergang zum Tode und den Tod selbst der Zelle bedeutet. Wir wissen ja aus der Pathologie, daß gerade solche rapide Eiweißeinschmelzungen in den Zellen eines Organismus den Untergang dieser Zellen bedeuten, ganz abgesehen von der biologischen Bedeutung solcher Prozesse für den Wirt, was gerade manchmal sinnreich oder heilend sein kann, manchmal aber auch den Tod des Wirtes bedeutet.

Ganz umgekehrt muß die Eiweißspaltung bei der beinahe neutralen Zellreaktion durch vielerlei Mechanismen geregelt werden. Selbstverständlich mögen da physikalisch-chemische Zustandsänderungen der Zellkolloide eine Hauptrolle spielen. Wenn auch im Autolysat durch teilweises Zerstören der Zellen manche Regulationen wegfallen,

so ist immerhin daran zu denken, daß die Regulation durch eine sogenannte Antitryptase (Antitrypsin) bestehen bleibt, mag es ein Körper oder, was wir eher anzunehmen geneigt sind, auch nur eine Zustandsform der Kolloide mit spezifischer Bedeutung sein.

Dieses „Antitrypsin" ist besonders im Serum tätig. Nun wissen wir ja aber einerseits, daß auch Organzellen Antitrypsinträger sind [*Rosemann*[1])], andererseits, daß auch Serum die Organautolyse hemmt[2]). So war es von Interesse festzustellen, wie sich das „Antitrypsin" gegenüber der Organautolyse bei verschiedenen Wasserstoffionenkonzentrationen verhält.

Es wurden drei Reihen von Kölbchen A, B und C angesetzt. Die Reihe A enthielt Serum (als Antitrypsin) + Puffermischung, die Reihe B Leberemulsion + Puffermischung, die Reihe C Serum + Leberemulsion + Puffermischung. Alle drei Reihen kamen gleichzeitig in den Thermostaten; nach Verlauf einer bestimmten Zeit wurde in ihnen nach Enteiweißung (kolloidales Eisenhydroxyd) der Rest-N bestimmt. In den einzelnen Portionen wurde der Anfang-Rest-N bestimmt.

Tabelle VII.

Je 1 ccm Kaninchenserum, je 5 ccm 10proz. Leberemulsion, je 5 ccm Acetat- oder Phosphatpuffer. Dauer 48 Stunden.

Versuchsbedingungen	A Serum		B Leber		C Serum + Leber		C—A	C—A—B
	Rest-N mg	Rest-N Zuwachs	Rest-N mg	Rest-N Zuwachs	Rest-N mg	Rest-N Zuwachs	Rest-N Zuwachs	Rest-N Zuwachs
$p_H = 3,8$ . . .	0,63	0,21	3,64	1,19	6,04	3,24	3,03	+ 1,84
$p_H = 5,0$ . . .	0,42	0	3,22	0,77	3,50	0,70	0,70	— 0,07
$p_H = 7,0$ . . .	0,42	0	2,73	0,28	2,95	0,15	0,15	— 0,13
Vor d. Versuch	0,42	—	2,45	—	2,80	—	—	—

Wir führen einen zweiten solchen Versuch nicht an, weil er vollkommen gleichbedeutend verlief. Es wurde somit gefunden, daß das Serum die Leberautolyse nur im neutralen Medium merklich hemmt, bei der bereits unphysiologischen Reaktion $p_H = 5$ ist nur der Rest einer Hemmung zu erfassen, im sauren Medium dagegen ist nicht nur keine Hemmung zu beobachten, sondern es wird das Serum von der Leberpepsinase recht bedeutend angegriffen, was durch die Zahl + 1,84 mg illustriert wird.

Wenn somit festgestellt werden konnte, daß der Regulationsmechanismus eines Antitrypsins nur für die neutrale Reaktion existiert, also im Autolysat bei der Pufferung $p_H = 7$ vorliegen kann, so erwuchs

[1]) *Rosemann*, Klin. Wochenschr. 1923; diese Zeitschr. **129**, 101.
[2]) *Baer* und *Loeb*, l. c.

daraus die nächste Frage, ob das Anwachsen der Autoproteolyse unter diesen Bedingungen in einigen Tagen nach Ansetzen des Autolyseversuchs durch irgendwie bedingte Zerstörung des Antitrypsins erklärt werden kann.

Zur Entscheidung dieser Frage wurde ein folgender Versuch angestellt:

2 ccm Kaninchenserum wurde mit 8 ccm eines Acetatgemisches $p_H = 5$ versetzt, nach kurzem Stehen neutralisiert und der antitryptische Index nach *Fuld-Gross* bestimmt. Eine zweite ebensolche Portion wurde für 7 Tage in den Thermostaten bei 37° C gestellt, danach neutralisiert und der Index bestimmt. Im ersten Falle erhielten wir einen Index = 200, im zweiten unter 100. Der Puffer $p_H = 5$ wurde von uns als die äußerste Grenze der möglichen Säuerung im freiwillig verlaufenden autolytischen Prozeß genommen, denn wie bereits erwähnt, übersteigt diese nicht einmal $p_H = 6$. Somit wäre wenigstens *eine* Erklärung für das Ansteigen der im neutralen Puffer verlaufenden Autoproteolyse gefunden.

Im weiteren schien es uns von Interesse festzustellen, ob eine Pepsinase im Autolysat eine nach unseren Versuchen wohl dort ebenfalls vorhandene Tryptase zerstören könnte. Wäre dieses der Fall, dann könnte man ja auch verstehen, weshalb wir wenigstens in drei Versuchsreihen (Tabellen I, III und IV) eine Erschöpfung des im neutralen Medium arbeitenden Ferments gegenüber dem Eigenprotein beobachten konnten. Unsere diesbezüglichen Versuche stellten wir mit Pepsin und Trypsin an, selbstverständlich können daraus nur Analogieschlüsse gezogen werden, denn wäre die Organpepsinase so wenig alkalifest, daß sie, wie das Pepsin, durch die Körpersäfte rapide zerstört werden sollte[1]), so könnte sie ja überhaupt nicht in der Zelle existieren.

Versuch A (Wirkung von Pepsin auf Trypsin).

Gemisch 1.	0,25 proz. Trypsin	10 ccm
	0,1 „ Pepsin	10 „
	Puffer $p_H = 3,8$	5 „
Gemisch 2.	0,25 proz. Trypsin	10 „
	H_2O	10 „
	Puffer $p_H = 3,8$	5 „

Toluolschutz.

Nach 22 Stunden:

a) 2 ccm *Gemisch 1* + 10 ccm Puffer $p_H = 7,8$ + 5 ccm 1 proz. Casein,
b) 2 „ „ *2* + 10 „ „ $p_H = 7,8$ + 5 „ 1 „ „

Nach 24 Stunden im Thermostaten bei 37° C Rest-N für:

a = 4,50 mg (93)
b = 4,83 „ (100)

1) *K. Voigt*, diese Zeitschr. **142**, 101.

Versuch B.

Gemisch 3. Dasselbe, jedoch 0,2 proz. Pepsinlösung. Außerdem noch 10 ccm Trypsinlösung + 15 ccm H_2O, entsprechend Reihe C wie a und b.

Nach 48 Stunden im Thermostaten bei 37° Rest-N für:

a = 4,31 mg (90)
b = 4,78 „ (100)
c = 4,30 „ (90)

Nach 6 × 24 Stunden im Thermostaten bei 37° C Rest-N für:

a = 4,69 mg (87)
b = 5,41 „ (100)
c = 4,07 „ (75)

Es geht aus diesen Versuchen hervor, daß in Gegenwart von Pepsin die Trypsinaktivität fällt, aus dem Versuch B ersehen wir außerdem, daß das Trypsin in wässeriger Lösung sich viel schlechter konservieren läßt wie in saurem Milieu ($p_H = 3,8$).

Es stellte sich in einem weiteren Versuch heraus, daß die Wasserstoffionenkonzentration $p_H = 3,8$ das Trypsin am besten konserviert, größere und geringere Säuerung schädigen das Ferment.

Es wurden folgende Gemische hergestellt:

Nr. 1. 10 ccm Pufferlösung $p_H = 3,0$ + 10 ccm 0,2 proz. Trypsinlösung
„ 2. 10 „ „ $p_H = 3,8$ + 10 „ 0,2 „ „
„ 3. 10 „ „ $p_H = 5,0$ + 10 „ 0,2 „ „
„ 4. 10 „ „ $p_H = 6.0$ + 10 „ 0,2 „ „
„ 5. Wasser + 10 ccm 0,2 proz. Trypsinlösung
Toluolschutz

Nach 10 × 24 Stunden wurden folgende Reihen angesetzt:

a) 2 ccm Gemisch Nr. 1 + 15 ccm Pufferlösung $p_H = 7,8$ + 5 ccm 1 proz. Caseinlösung.
b) 2 ccm Gemisch Nr. 2 + 15 ccm Pufferlösung $p_H = 7,8$ + 5 ccm 1 proz. Caseinlösung.
c) 2 ccm Gemisch Nr. 3 + 15 ccm Pufferlösung $p_H = 7,8$ + 5 ccm 1 proz. Caseinlösung.
d) 2 ccm Gemisch Nr. 4 + 15 ccm Pufferlösung $p_H = 7,8$ + 5 ccm 1 proz. Caseinlösung.
e) 2 ccm Gemisch Nr. 5 + 15 ccm Pufferlösung $p_H = 7,8$ + 5 ccm 1 proz. Caseinlösung.

Nach 22 Stunden im Thermostaten bei 37° C Rest-N für:

a = 3,2 mg (65)
b = 4,92 „ (100)
c = 3,37 „ (68)
d = 2,11 „ (43)
e = 1,47 „ (30)

Wie gesagt, können diese Versuche selbstverständlich nicht ohne weiteres auf die gegenseitige mögliche Beeinflussung von Pepsinase und Tryptase im autolytischen Prozeß übertragen werden. Die *Möglichkeit* einer Analogie liegt jedoch auf der Hand. Beim Stehenlassen

des Autolysats kann die Tryptase eben nicht nur durch eine Pepsinase zerstört werden, sondern auch ganz automatisch durch „Lagern“ in einem Milieu, welches, wie bei der Autolyse, lange nicht das Aufbewahrungsoptimum bei $p_H = 3{,}8$ erreicht. Diese beiden Faktoren würden dann das beschleunigte Abklingen der tryptischen Verdauung bei der Autolyse erklären; der so oft beobachtete Anstieg würde eine Erklärung in der Zerstörung des Antitrypsins finden.

Zusammenfassung.

1. Beim Fortschreiten des autolytischen Prozesses wird die Eigenproteinspaltung wie die Caseinolyse im neutralen ($p_H = 7$) und sauren Medium ($p_H = 3{,}8$) nicht gleichsinnig verändert. Im sauren Medium klingt die Proteinolyse regelmäßig ab, im neutralen Medium tritt ein rascheres Abklingen ein und ist beinahe immer eine Phase der verstärkten Lyse zu beobachten. Dieses läßt daran denken, daß im Autolysat zum mindesten nicht ein Ferment vorliegt.

2. Die Erklärung dieser Tatsache mag darin zu suchen sein, daß das Antitrypsin (Serum) bei der Autolyse zerstört wird und nur im neutralen Medium wirkt, daß Trypsin bei der Autolyse zerstört wird einmal durch „Lagern“ in einem für die Konservierung ungünstigen Milieu und zweitens durch die Einwirkung von Pepsinase.

Untersuchungen über die proteolytischen Leberfermente.

Von

L. Utkin-Ljubowzow.

(Aus der Abteilung für experimentelle Pathologie und Pharmakologie des staatlichen Chemo-Pharmazeutischen Forschungsinstituts zu Moskau.)

(Eingegangen am 11. Februar 1925.)

Mit 10 Abbildungen im Text.

Die ausführlichen Versuche von *Rona* und *Mislowitzer*[1]) über die Leberautolyse zwangen sie zur Annahme nur eines tätigen proteolytischen Ferments bei diesem Prozeß, dem sie den Charakter einer Pepsinase zuschrieben. Die Frage nach den Fermenten im normalen Verlauf der Autolyse und bei intrazellularen Zellprozessen in vivo blieb offen. Aus den Arbeiten von *Sevringhaus*[2]) u. a., was in letzter Zeit auch von *Rona* und *Mislowitzer* (l. c.) bestätigt wurde, ist die Säuerung beim normalen Verlauf der Autolyse bei weitem nicht so hoch, wie man früher anzunehmen geneigt war; trotz Anhäufung von Säuren übersteigt die Wasserstoffionenkonzentration nicht bestimmte Grenzen und schwankt zwischen $p_H = 6$ bis 7, indem zuerst ein Anstieg und dann ein Abfall zu beobachten ist, was durch Bildung von Eiweißspaltprodukten, welche als Puffer dienen, zu erklären ist.

Vergleichen wir diese normale Säuerung des Autolysats mit dem Optimum der Pepsinase ($p_H = 3{,}6$ bis 3,8, *Rona* und *Mislowitzer*), so müssen wir feststellen, daß die normale Autoproteolyse das Arbeitsresultat einer Pepsinase in äußerst ungünstigen Bedingungen darstellt, es sollte tatsächlich nur dieses Ferment autolysieren [von einer Peptase abgesehen, deren Existenz schon vor längerer Zeit bewiesen ist[3])]. Noch mehr ist die Fähigkeit dieser Pepsinase unverständlich, die Wirkung in so breiten Grenzen der Wasserstoffionenkonzentration zu offenbaren: in den Versuchen von *Rona* und *Mislowitzer* war die Proteolyse bei $p_H = 7{,}5$ bis 7,8 gering, aber noch deutlich. Zieht man den

---

[1]) Diese Zeitschr. **140**, 517, 1923; **146**, 1, 1924; *Rona, Mislowitzer* und *Seidenberg*, ebendaselbst **146**, 26, 1924.

[2]) *Sevringhaus, Koehler* und *Bradley*, Journ. of biol. Chem. **57**, 163, 1923.

[3]) *Abderhalden* und Mitarbeiter, Zeitschr. f. physiol. Chem. **47**, 466; **49**, 1; **48**, 537.

Umstand in Betracht, daß das Optimum der Pepsinase bei einer physiologisch undenkbaren Reaktion liegt, glaubten wir berechtigt zu sein, mit einer Reihe anderer Forscher[1]) die Existenz eines zweiten Ferments (oder mehrerer Fermente) mit einem der Reaktion der Zellsäfte näheren Optimum anzunehmen. Ähnliche Betrachtungen und auf die Lösung dieser Fragen hinzielende Versuche sind bereits in der vorhergehenden Arbeit von *O. Steppuhn* und *Xenia Utkin-Ljubowzow* mitgeteilt, ich wurde vor die Aufgabe gestellt, die indirekte Beweisführung durch direkte Versuche zu bekräftigen.

Der Umstand, daß die mit ausgezeichneter Sorgfalt durchgeführten Versuche von *Rona* und *Mislowitzer* nicht die Existenz anderer Fermente direkt zu zeigen imstande waren, ließ uns an antitryptische Eigenschaften der Zellsäfte oder an besondere Resistenz der Zellproteine gegenüber einer Tryptase im Autolyseprozeß denken. Dieses veranlaßte mich, den gewöhnlichen Weg der Autolyse zu verlassen und zur Klärung der aufgeworfenen Frage ein anderes Substrat einzuführen — ich fixierte mich auf Casein. Im Zusammenhang damit war es selbstverständlich nötig, nach Möglichkeit die Organproteine auszuschließen und mit den Fermentlösungen des Organs zu arbeiten.

Es hat sich die folgende Methode gut bewährt: Schwemmt man das sehr fein zerriebene Organ in destilliertem Wasser auf und setzt eine Pufferlösung von $p_H = 4{,}7$ bis 5,0 hinzu, so fällt die größte Menge der Proteine in diesem Flockungsoptimum aus und kann abfiltriert werden. Dabei findet eine Verteilung der Fermente zwischen dem Niederschlag und der Lösung statt — die Lösung enthält aber für die Anstellung der Versuche genügende Mengen der Proteasen. Daß dabei nicht alle Proteine ausflocken, zeigt ein folgender Versuch.

Versuch 1. 10proz. Leberbreiaufschwemmung in destilliertem Wasser. 10 ccm enthalten 22,7 mg Gesamt-N und 4,6 mg Rest-N (bestimmt nach Ausfällen der Proteine mit kolloidalem Eisenhydroxyd). 10 ccm Aufschwemmung wurden mit 2 ccm n/10 Essigsäure und 2 ccm n/10 Na-Acetat vermischt. Die ausgefällten Proteine wurden abfiltriert. Im Filtrat: Gesamt-N = 11,2 mg, Rest-N = 4,7 mg, somit enthielt die Aufschwemmung vor der Fällung 18,1 mg Protein-N, nach der Fällung — 6,5 mg, d. h. in den Niederschlag gelangten etwa 65 Proz. des Gesamteiweißes. Die restierenden 35 Proz. unterscheiden sich chemisch von dem Protein des Niederschlags, denn bei Neutralisierung des klaren Filtrats wird es durch ausfallende Proteine von neuem getrübt; diese besondere uns interessierende Frage soll an dieser Stelle nicht weiter behandelt werden.

Das auf angegebene Weise von der Hauptmenge des Eiweißes befreite Filtrat diente bei meinen Versuchen als proteolytische Leberfermentlösung. Die Arbeitsmethode war folgende: In eine Reihe von

[1]) *Dernby* und andere, Journ. of biol. Chem. **35**, 181, 1918.

Kölbchen wurden gegeben: 10 ccm Pufferlösung (je nach der gewünschten H-Ionenkonzentration benutzte ich Acetat oder Lactatmischungen, die gewünschte Alkalität wurde mit Hilfe von Phosphatmischungen oder einfach mit n/10 Natronlauge angestellt), 5 ccm unserer Leberfermentlösung [erhalten durch Fällung von 40 ccm einer 10proz. Aufschwemmung von mit physiologischer NaCl-Lösung gewaschener und fein zerriebener Leber[1]), mit 5 ccm einer Mischung aus gleichen Teilen n/10 Essigsäure und Natriumacetat], 5 ccm einer 1proz. Caseinlösung. (Die Caseinlösung wurde jedesmal frisch bereitet, indem 0,4 g Casein in 25 ccm n/50 NaOH unter Erwärmen gelöst, durch n/10 HCl nach Lackmus neutralisiert und auf 40 ccm verdünnt wurden.) Nach Zugabe einiger Tropfen Toluol wurden die Kolben gut verkorkt in den Thermostaten (37°) gestellt. Ein Kölbchen diente zur Bestimmung der Anfangsmenge des Rest-N; der Inhalt desselben wurde nach Neutralrot tropfenweise neutralisiert, auf dem Wasserbade erwärmt und mit 5 ccm einer 1proz. kolloidalen Eisenoxydlösung und einigen Tropfen gesättigter K_2SO_4 gefällt, auf 50 ccm verdünnt, durch ein trockenes Filter filtriert und in einem Teile des Filtrats der N nach *Kjeldahl* (Mikro) bestimmt. Nach Verlauf einer bestimmten Zeit wurde aus den Kölbchen im Thermostaten zu je 5 ccm Flüssigkeit entnommen und der Rest-N wie oben bestimmt; andere je 5 ccm dienten zur Bestimmung der H-Ionenkonzentration nach der elektrometrischen Methode. Die Gehaltsdifferenzen an Rest-N in Milligrammen zwischen den Kölbchen im Thermostaten und dem Anfangsgehalt dienten als Maß für die Spaltung des Caseins (in der Tabelle als Rest-N-Zuwachs bezeichnet). Schon die zwei ersten, ohne Bestimmung der p_H angestellten Orientierungsversuche zeigten, daß die Caseinspaltungskurve durch Leberproteasen mindestens zwei Maxima hat.

Versuch 2. Eine 10proz. Aufschwemmung von Kaninchenleber, die 33 Tage mit Toluol bei Zimmertemperatur gestanden hatte, wurde, wie oben beschrieben, behandelt. Anfangs Rest-N = 1,44 mg, Versuchsdauer 46 Stunden, Acetatpuffer.

Tabelle I.

	1	2	3	4	5
p_H, berechnet etwa . .	4,7	4,4	4,1	3,8	3,5
Rest-N, mg	2,62	2,57	2,75	3,44	3,83
„ Zuwachs . . .	1,18	1,13	1,31	2,00	2,39

Versuch 3. Dieselbe Leber, anfangs Rest-N = 1,61 mg, Dauer 43 Stunden, Acetatpuffer.

[1]) Die Bereitung der Aufschwemmung siehe *Steppuhn* und *L. Utkin-Ljubowzow*, II. Mitteilung, diese Zeitschr. 150.

Tabelle II.

	1	2	3	4	5
p_H, berechnet etwa . .	5,9	5,6	5,3	5,0	4,7
Rest-N, mg	3,35	3,47	3,21	2,70	2,27
„ Zuwachs . . .	1,74	1,86	1,60	1,09	0,66

Diese Vorversuche zeigen, daß das eine Maximum, berechnet, etwa bei p_H 5,5, das andere, in stark saurer Lösung, bei etwa p_H 3,5 liegt. Was das zweite Ferment betrifft, so ist dasselbe ohne Zweifel identisch mit der Pepsinase von *Rona* und *Mislowitzer*. Charakteristisch ist, daß die Proteolysekurve ein deutliches Minimum bei etwa p_H 4,5 hat. Nach diesem Vorversuch stellte ich mir die Aufgabe, die Lage der Optimalpunkte der Spaltung genauer zu bestimmen.

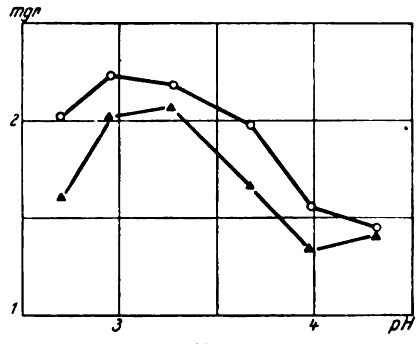


Abb. 1.

Versuch 4. Leber schwach ausgewaschen. Die Suspension hatte 28 Tage bei Zimmertemperatur gestanden. Vorbehandlung wie oben Anfangs Rest-N = 2,74 mg. Lactatpuffer. Die p_H wurde elektrometrisch bestimmt. Die Resultate sind in Abb. 1 und Tabelle III wiedergegeben.

Tabelle III.

	1	2	3	4	5	6
p_H, elektrometrisch . .	4,32	3,98	3,67	3,27	2,96	2,70
Rest-N, nach 46 Std. .	4,16	4,07	4,39	4,80	4,75	4,35
„ Zuwachs . . .	1,42	1,33	1,65	2,06	2,01	1,61
„ nach 122 Std. .	4,18	4,30	4,72	4,92	4,97	4,75
„ Zuwachs . . .	1,44	1,56	1,98	2,18	2,23	2,01

Versuch 5. Kaninchenleber, nicht gewaschen. Frische Aufschwemmung. Anfangs-Rest-N = 2,25 mg. Lactatpuffer. Ergebnisse in Tabelle IV und Abb. 2.

Tabelle IV.

	1	2	3	4	5	6
p_H, elektrometrisch . .	4,22	3,96	3,67	3,39	3,08	2,81
Rest-N, nach 46 Std. .	4,83	5,60	6,42	6,57	6,37	5,80
„ Zuwachs . . .	2,58	3,35	4,17	4,32	4,12	3,55
„ nach 123 Std. .	5,08	6,01	6,38	6,88	6,43	5,80
„ Zuwachs . . .	2,83	3,76	4,13	4,63	4,18	3.55

Beide Kurven zeigen ein deutlich ausgeprägtes Maximum zwischen p_H = 3,0 und 3,5. Dieses Maximum fällt nicht genau mit dem von *Rona* und *Mislowitzer* bei der Leberautolyse gefundenen überein, es ist etwas nach der sauren Seite verschoben. Da kein Grund vorliegt anzunehmen, daß die Leberpepsinase des Kaninchens ein anderes Wirkungsoptimum haben könnte als die Leberpepsinase des Meerschweinchens, mit der *Rona* und *Mislowitzer* arbeiteten, so ist offenbar ein anderer Grund vorhanden, weswegen beide Optima nicht zusammenfallen. Ich werde später auf dieses zurückkommen.

Da die Spaltungskurve des Caseins über ein Minimum in ein zweites Maximum bei etwa p_H 5,5 übergeht, so versuchte ich, diesen

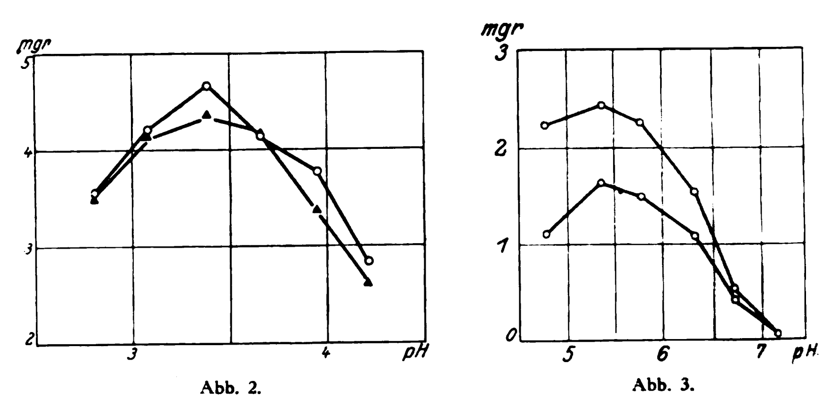


Abb. 2. Abb. 3.

Teil der Kurve zu analysieren, um die Lage dieses zweiten Maximums zu bestimmen.

Versuch 6. Kaninchenleber schwach gewaschen. Die 10proz. Suspension hatte 5 Tage bei Zimmertemperatur gestanden. Übliche Vorbehandlung. Acetatpuffer. Anfangs Rest-N = 2,04 mg. Ergebnisse in Tabelle V und Abb. 3.

Tabelle V.

	1	2	3	4	5	6
p_H, elektrometrisch . .	7,18	6,70	6,32	5,77	5,37	4,78
Rest-N, nach 22 Std. .	2,10	2,44	3,11	3,52	3,66	3,14
„ Zuwachs . . .	0,06	0,40	1,07	1,48	1,62	1,10
„ nach 68 Std. .	2,08	2,55	3,56	4,28	4,46	4,27
„ Zuwachs . . .	0,04	0,51	1,52	2,24	2,42	2,23

Versuch 7. Kaninchenleber nicht gewaschen. Aufschwemmung frisch bereitet. Vorbereitung wie oben. Acetatpuffer. Anfangs Rest-N 2,25 mg. Tabelle VI, Abb. 4.

Tabelle VI.

	1	2	3	4	5	6
p_H. elektrometrisch . .	7,38	6,56	6,08	5,49	5,19	4,78
Rest-N, nach 68 Std. .	2,27	3,54	4,46	5,25	5,25	5,05
„ Zuwachs . . .	0,02	1,29	2,21	3,00	3,00	2,80
„ nach 166 Std.	2,25	3,73	4,79	5,89	5,90	5,75
„ Zuwachs . . .	0,00	1,48	2,54	3,64	3,65	3,50

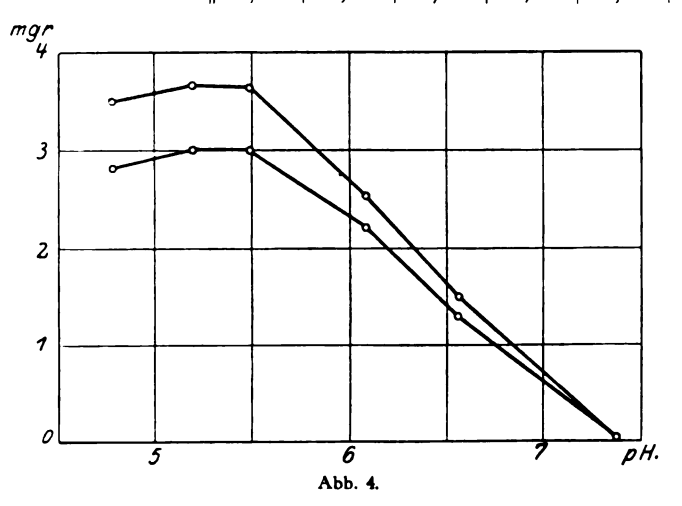


Abb. 4.

Die Resultate der zwei Versuche sind durchaus befriedigend, beide ergaben ein Maximum zwischen p_H 5,2 bis 5,4.

Mithin haben wir zwei Optima für die Caseinspaltung durch Leberproteasen. Diese Optima sind durch ein ausgesprochenes Minimum getrennt, wie Versuch 8 zeigte.

Versuch 8. Kaninchenleber (wie bei Versuch 6) bei Zimmertemperatur 8 Tage gestanden. Acetatpuffer. Anfangs Rest-N 3,01 mg. Tabelle VII, Abb. 5.

Tabelle VII.

	1	2	3	4	5
p_H. elektrometrisch . .	5,41	5,21	4,75	4,19	3,73
Rest-N, nach 25 Std. .	3,93	4,20	3,65	3,70	4,06
„ Zuwachs . . .	0,92	1,19	0,64	0,69	1,05
„ nach 75 Std. .	4,83	4,92	4,63	4,15	4,63
„ Zuwachs . . .	1,82	1,91	1,62	1,14	1,62

Wenn wir die angeführten Versuche mit den Versuchen von *Rona* und *Mislowitzer* über den Einfluß der H-Ionenkonzentration bei der Leberautolyse vergleichen, so bemerken wir einen großen Unterschied. Während bei der Leberautolyse die Spaltungskurve, mit der Wasser-

stoffionenkonzentration stetig steigend, nur ein Maximum bei $p_H = 3{,}8$ bis 3,6 hat, weist die Spaltungskurve des Caseins zwei deutlich ausgesprochene Maxima und zwischen ihnen ein deutliches Minimum auf. Für dieses Minimum ist charakteristisch, daß es fast genau mit der isoelektrischen Zone des Caseins zusammenfällt [der isoelektrische Punkt liegt für Casein bei $p_H = 4{,}6$[1])].

Wie aus den neuesten Arbeiten *J. Loebs*[2]) bekannt ist, sind die Eiweißstoffe im isoelektrischen Punkte am wenigsten reaktionsfähig. Vielleicht ist damit die Ausbildung des Minimums auf der Spaltungskurve des Caseins zu erklären, denn gewöhnlich geben zwei Fermente, die auf dasselbe Substrat wirken und verschiedene Optimalpunkte haben, ein gemeinsames Maximum aus der Kurve, das zwischen den beiden Optimalpunkten liegt. Es ist sehr möglich, daß wir es bei den Versuchen von *Rona* und *Mislowitzer* mit einem solchen kombinierten Maximum zu tun haben, das näher zum Optimalpunkt der Pepsinase als zum Optimum des zweiten Ferments liegt wegen der vielleicht größeren Resistenz der Lebereiweißstoffe gegenüber diesem zweiten Ferment.

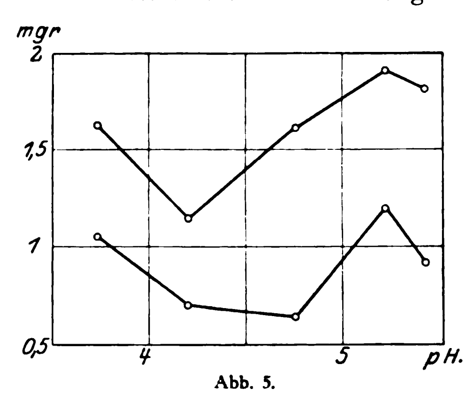


Abb. 5.

Es entsteht jedoch die Frage, warum bei der Leber, deren Eiweißstoffe in ihrer Hauptmenge (wie aus Versuch 1 ersichtlich) dasselbe Flockungsoptimum wie das Casein haben, wir nicht auch wie beim Casein ein Minimum in der Autolysenkurve beobachten. Die Antwort auf diese Frage ist sehr schwierig, wahrscheinlich ist bei der Leber, bei welcher ein Konglomerat von verschiedenen Eiweißstoffen mit verschiedenen physiko-chemischen Eigenschaften vorliegt, der Einfluß der Säuerung eine viel kompliziertere Erscheinung als beim Casein, und die Kurve, die die Abhängigkeit der Leberautolyse von dem Säuregrad wiedergibt, ist die Resultierende aller Einwirkungen sowohl auf die Eiweißstoffe als auch auf die Fermente der Leber. Ich glaube, daß diese Frage durch Studium der Eigenschaften der einzelnen Eiweißstoffe der Leber und ihr Verhalten zu den einzelnen Leberfermenten, nachdem dieselben auf Grund ihres physiko-chemischen Verhaltens isoliert wurden, zu lösen ist. Versuche in dieser Richtung habe ich

---

[1]) *Michaelis* und *Pechstein*, diese Zeitschr. **41**.
[2]) Journ. of gen. Physiol. **1**, 1919.

begonnen. Es ist dies das Problem, das *Euler*[1]) bereits vor einigen Jahren aufgestellt hat: „. . . besonders verdient die Frage, ob die Acidität der Lösungen nur die Wirksamkeit der Enzyme, nicht auch die Reaktionsfähigkeit der Substrate beeinflußt, noch eingehende Untersuchungen".

Die Untersuchungen auf diesem Gebiet von *Northrop*[2]) zeigten, daß die Wirkungskurve der Protease in ihrer Abhängigkeit von dem Säuerungsgrad des Substrats zusammenfällt mit der Dissoziationskurve des Substrats, was sich durchaus mit meinen Versuchen deckt. Die Ansicht *Willstätters* und *Grassmans*[3]), daß es Fermente gäbe, die speziell auf nicht dissoziierte Eiweißmoleküle eingestellt seien, steht in Widerspruch zu den von *J. Loeb* erzielten Resultaten (l. c.). Ganz unverständlich sind mir die Angaben *Hertzmanns* und *Bradleys*[4]) bezüglich der proteolytischen Leberfermente. Aus ihren Versuchen folgt, daß letztere ebenso wie Papain bei *Willstätter* und *Grassmann* (l. c.) auf das undissoziierte Eiweißmolekül eingestellt seien und ihr Wirkungsoptimum daher mit dem isoelektrischen Punkte des Substrats zusammenfalle. Bei der Spaltung des Edestins fanden sie das Optimum bei $p_H = 7{,}0$ liegend, während der isoelektrische Punkt des Edestins bei $p_H = 6{,}9$ liegt. Was das Edestin anbelangt, so habe ich mit diesem Eiweißstoff einige Versuche angestellt, wobei ich das auf obige Weise hergestellte Filtrat benutzte. In allen Fällen erhielt ich, wie ich nach meinen Versuchen mit Casein auch erwartete, Resultate, die denen von *Hertzmann* und *Bradley* direkt entgegengesetzt waren, nämlich sehr schwache Spaltung beim Neutralpunkt, Steigerung bei $p_H = 5$, starken Anstieg bei weiterer Säuerung, Optimum bei $p_H = 4$, dann Abfall. Einen der Versuche führe ich an.

Versuch 8a. Kaninchenleber, gut gewaschen. Die 10proz. Aufschwemmung stand bei 0° 20 Tage. Übliche Behandlung derselben. 0,4 g Edestin (*Merck*) wurde mit Wasser angerieben und durch tropfenweisen Zusatz von n/10 HCl fast vollständig gelöst und filtriert. Acetatpuffer. Anfangs-Rest-N = 3,03 mg. Tabelle VIIa, Abb. 6.

Tabelle VIIa.

	1	2	3	4	5	6
p_H, elektrometrisch . .	6,27	5,86	5,01	4,49	3,79	3,52
Rest-N, nach 50 Std. .	3,14	3,43	4,14	5,35	5,87	5,50
„ Zuwachs . . .	0,11	0,40	1,11	2,32	2,84	2,47
„ nach 98 Std. .	3,41	3,62	4,38	6,00	6,47	6,10
„ Zuwachs . . .	0,38	0,59	1,35	2,97	3,44	3,07

[1]) *H. Euler*, Die Chemie der Enzyme, I. Teil, S. 34, 1920.
[2]) Naturwiss. **11**, 713, 1923.
[3]) Zeitschr. f. physiol. Chem. nach *Oppenheimer*, Die Fermente usw., Lieferung II, 1924, S. 204 zitiert.
[4]) Proc. Amer. Soc. Biol. Chem. **18**, 19, 1923.

Entsprechend der Lage des isoelektrischen Punktes ist der Charakter der Kurve durchaus verschieden von der des Caseins. Wo wir beim Casein das Minimum haben, ist beim Edestin die größte Steigung, da an dieser Stelle der p_H-Skala das Edestin bereits sehr stark dissoziiert ist (die Lösung ist bei 4 nur opaleszierend, bei 3 stark trübe, bei 1 und 2 fällt ein Niederschlag). Somit besitzen die Leberproteasen keine

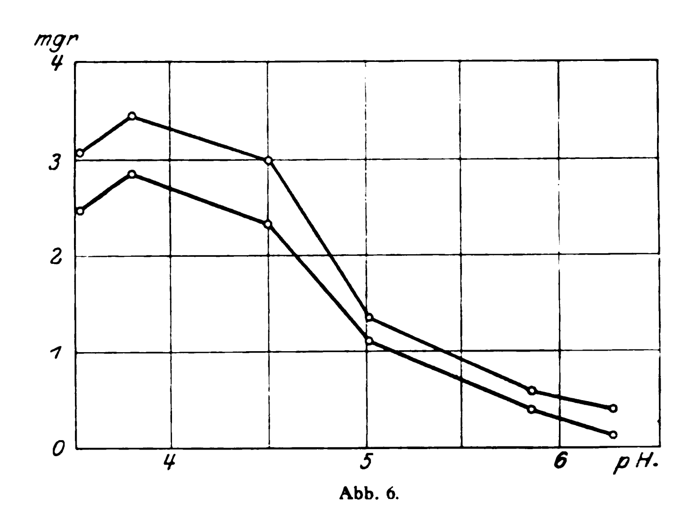


Abb. 6.

spezifische Fähigkeit, undissoziiertes Eiweiß zu spalten, im Gegenteil, ihre Wirkung geht teilweise dem Dissoziationsgrad des Substrats parallel.

Das Maximum der Edestinspaltungskurve ist offenbar ein zusammengesetztes (s. oben), an dessen Zustandekommen beide Fermente beteiligt sind.

Ich bin also der Ansicht, daß die von uns gefundenen zwei Maxima in der Spaltungskurve des Caseins *zwei* proteolytischen Leberfermenten entsprechen. Obgleich schon die erhaltenen Zahlen dafür sprechen, daß wir es hier mit zwei voneinander unabhängigen Prozessen zu tun haben, so habe ich dennoch Versuche angestellt, ihre Unabhängigkeit zu beweisen. Erstens untersuchte ich das Verhalten des proteolytischen Systems in meinem Filtrat zu Adsorbenten.

Versuch 9. Kaninchenleber. Die 10proz. Aufschwemmung bei Zimmertemperatur, 1 Monat gestanden. Behandlung wie gewöhnlich. Das Filtrat wurde in 2 Teile geteilt, der eine (A) wurde direkt benutzt, der andere (B), ungefähr 20 ccm, wurde mit 0,5 g Kaolin behandelt und filtriert. Im Filtrat wurde p_H elektrometrisch gemessen, es war = 4,93. Mit beiden Teilen wurde Casein gespalten. Acetatpuffer. Tabelle VIII.

Tabelle VIII.

	A		B	
	1	2	1	2
p_H, elektrometrisch	5,77	3,74	5,85	3,77
Anfangs-Rest-N	3,92	3,92	3,61	3,61
Rest-N nach 46 Std.	7,53	7,13	5,55	5,25
„ Zuwachs	3,61	3,21	1,94	1,64

Verhältnis 2 : 1 = 0,89   2 : 1 = 0,85.

Aus Versuch 9 ist zu ersehen, daß beide Fermente bei dem Säuregrad $p_H = 4{,}93$ sich zu Kaolin vollkommen gleich verhalten, denn das Verhältnis ihrer Wirkungen bleibt dasselbe. Es ist dies um so merkwürdiger, als der proteolytische Effekt durch das Kaolin sehr vermindert wird, d. h. der größte Teil der Fermente vom Kaolin adsorbiert wird.

Versuch 10. Kaninchenleber. Frische Aufschwemmung. Filtrat nach Lackmus neutralisiert, wobei sich starke Trübung und ein Niederschlag bildete, filtriert, das Filtrat geteilt. Teil (B) 1 Stunde auf 56° erwärmt, wobei ein flockiger Niederschlag entstand. Dieser Niederschlag wurde nicht abfiltriert. Mit beiden Teilen wurden Caseinspaltungsversuche angestellt. Bei 1 Acetatpuffer, bei 2 Lactatpuffer. Tabelle IX.

Tabelle IX.

	A		B	
	1	2	1	2
p_H, elektrometrisch	5,20	3,41	5,31	3,33
Anfangs-Rest-N	2,57	2,57	2,57	2,57
Rest-N nach 47 Std.	4,30	5,57	3,30	4,40
„ Zuwachs	1,73	3,00	0,73	1,83
„ nach 70 Std.	4,83	5,90	3,59	4,93
„ Zuwachs	2,26	3,33	1,02	2,36

Verhältnis nach 47 Stunden 2 : 1 = 1,73   2 : 1 = 2,51
„ „ 70 „ 2 : 1 = 1,47   2 : 1 = 2,31

Obgleich man nach diesem Versuch glauben könnte, daß das bei $p_H = 5{,}20$ aktive Ferment von dem in stark saurer Lösung arbeitenden verschieden ist, kann ich diesen Versuch doch nicht als entscheidend ansehen, weil derselbe keine Daten enthält, aus denen man die Zeit für gleiche Umwandlungen berechnen könnte, ohne dieses lassen sich aber die Fermentmengen vielleicht nicht genau vergleichen. Wenn man die p_H der Optimalpunkte in meiner Caseinspaltungskurve durch die Leberproteasen mit den p_H-Werten anderer Autoren vergleicht, findet man nur geringe Ähnlichkeit. Die schon vielfach von mir zitierten Arbeiten *Ronas* und seiner Mitarbeiter beiseite lassend, möchte ich

folgende, mir nur erst kürzlich bekannt gewordenen Arbeiten erwähnen. *Schima*[1]), der den Einfluß der H-Ionenkonzentration auf die Leberautolyse studierte, fand vier Optimalpunkte bei $p_H = 3{,}24$, 7,15, 4,44 und 6,25. Wie man sieht, stimmt der Punkt 3,24 ziemlich gut mit dem von mir gefundenen Optimum für das in stark saurer Lösung arbeitende Ferment überein. Den Punkt 7,15 hält *Schima* für das Optimum der Peptase und die Punkte 4,44 und 6,25 sollen derjenigen Acidität entsprechen, bei der beide Fermente zusammen arbeiten. Ohne vorläufig das Ferment mit dem Optimalpunkt $p_H = 7{,}15$ zu berücksichtigen, muß ich gestehen, daß es für mich vollständig unerklärlich ist, wie die Punkte $p_H = 4{,}44$ und 6,25 erhalten wurden, und aus welchem Grunde sie den Bedingungen entsprechen sollen, die für die Zusammenarbeit beider Fermente günstig sind (leider war mir nur ein Referat der Arbeit zugänglich). Die zweite Arbeit ist von *Zachrisson*[2]), der aus Leberautolysaten ein Ferment isolierte, das Casein am besten bei $p_H = 5{,}0$ spaltet und das offenbar dem zweiten von mir in dieser Arbeit untersuchten Ferment entspricht. *Zachrisson* konnte kein Ferment finden, das Casein bei alkalischer Reaktion spaltet, und schloß hieraus, daß die Leber kein Analogon der von *Hedin*[3]) gefundenen α-Protease der Milz enthält. *Zachrisson* beobachtete die Wirkung des Leberferments auf das Pepton *Witte*, fand für dasselbe den optimalen Säuregrad $p_H = 7$ und identifizierte dasselbe mit dem Erepsin (Optimum $p_H = 7{,}8$).

Bezüglich eines Ferments, das Casein bei alkalischer Reaktion spaltet, waren meine Versuche ebenso wie *Zachrissons* negativ, wie aus den angeführten Tabellen und Abbildungen zu ersehen ist. Um mich endgültig davon zu überzeugen, daß das in beschriebener Weise gewonnene Leberfiltrat kein Casein bei alkalischer Reaktion spaltendes Ferment enthält, wurde noch folgender Versuch angestellt.

Versuch 11. Nicht gewaschene Kaninchenleber. Die Aufschwemmung hatte 9 Tage im Eisschrank gestanden. Übliche Bearbeitung. Acetatpuffer. Nr. 1 bis 4 mit n/10 NaOH alkalisch gemacht. Anfangs-Rest-N = 2,35 mg. Tabelle X, Abb. 7.

Tabelle X.

	1	2	3	4	5	6
p_H, elektrometrisch . .	9,01	8,12	7,51	7,08	6,29	5,69
Rest-N, nach 93 Std. .	2,31	2,32	2,38	2,72	4,30	5,03
„ Zuwachs . . .	0,00	0,00	0,03	0,37	1,95	2,68

[1]) *S. Schima*, Journ. of Biochem. **2**, 1, 1922.
[2]) Ber. über d. ges. Physiol. **23**, 138, 1924 (Ref.).
[3]) *Hedin*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **50**, 497, 1907.

Wenn man die Resultate in den Tabellen V, VI und X nebeneinander stellt, so kann man mit Bestimmtheit sagen, daß das nach der hier beschriebenen Methode gewonnene Leberfiltrat kein Ferment enthält, das Casein in alkalischer Lösung spaltet. Die Spaltung des Caseins beginnt bei einer H-Ionenkonzentration $p_H = 7{,}3$ bis 7,1 und steigt mit der Acidität der Lösung stark an. Wenn wir jetzt zu der Arbeit *Ronas* und *Mislowitzers* (erste Mitteilung) zurückkehren, so ist das erste, was auffällt, daß die Leberautolyse, wenn auch schwach, aber dennoch schon bei einem Säuregrad von $p_H = 7{,}5$ und sogar 7,8 (s. l. c., Abb. 1 und 17) vor sich geht. Von neuem taucht die Frage auf, ob es ein Leberferment vom Typus der Tryptase gibt. Natürlich ist die Tatsache, daß ich ein solches in dem Filtrat, aus dem der größte Teil der Eiweißstoffe entfernt war, nicht finden konnte, kein Beweis dafür, daß ein solches nicht existiert, denn wir wissen, wie fest und vollständig Fermente von Adsorbenten, besonders Eiweißstoffen, festgehalten werden können. Im vorliegenden Falle konnte dies um so eher der Fall sein, als ein proteolytisches Ferment eine besonders starke Affinität zum eigenen Substrat haben dürfte. Wenn andererseits die beiden Fermente, von denen bisher die Rede war, in bedeutender Menge im Filtrat gelöst bleiben, so ändert auch dies nichts an der Tatsache, denn das Verhältnis von Adsorbens zum Adsorbenten hängt von einer ganzen Reihe von Umständen ab, von denen der wichtigste die Reaktion des Mediums ist.

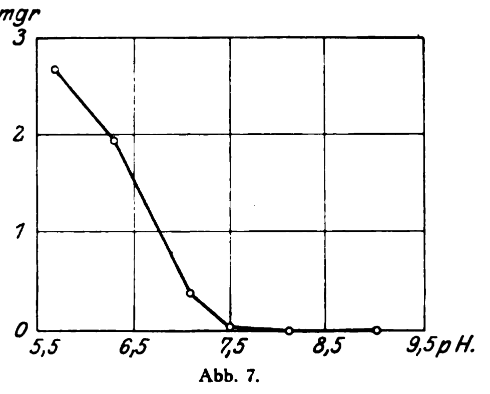


Abb. 7.

Vielleicht war der Säuregrad, dessen ich mich zur Fällung der Eiweißstoffe bediente, besonders günstig zur Mitfällung der Tryptase, besonders da mein Orientierungsversuch mit Casein-Trypsin lehrte, daß im Flockungsoptimum des Caseins ($p_H = 4{,}6$) das letztere sehr viel Trypsin mitreißt und, in alkalische Lösung gebracht, stark autolysiert. Aus angegebenem Grunde bemühte ich mich, die hypothetische Tryptase von den sie festhaltenden Eiweißstoffen zu befreien, wobei ich den schon von *Schierge*[1]) bei seinen Serumstudien eingeschlagenen Weg ging — den Weg der Veränderung der physiko-chemischen Eigenschaften des Eiweißes durch Denaturierung nach der einen oder anderen Methode.

[1]) Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **32**, 142.

Versuch 12. Kaninchenleber kalt aufbewahrt. 40 ccm 10proz. Aufschwemmung wie oben gefällt. Der Niederschlag nicht abfiltriert, sondern abzentrifugiert, einmal in der Zentrifuge mit destilliertem Wasser gewaschen, in 20 ccm Wasser suspendiert. Zur Aufschwemmung wurde das vierfache Volumen Aceton gegeben und 1 Stunde stehengelassen, dann der Niederschlag abgesaugt, mit Aceton und Äther gewaschen und im Vakuumexsikkator über H_2SO_4 getrocknet. Die erhaltene feste Masse wurde in der Reibschale zu einem feinen Pulver zerrieben (Gewicht 0,43 g). Ein Versuch, das Ferment aus dem Pulver mit Wasser auszuziehen, mißlang: das Filtrat war kaum aktiv, weswegen ich das Pulver selbst zu meinem Versuche benutzte. Das Pulver wurde mit Wasser geschüttelt und unter beständigem Schütteln in die Kölbchen mit Puffermischung abpipettiert und Caseinlösung zugegeben.

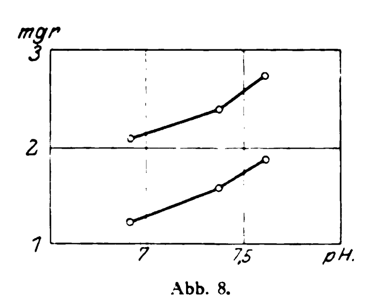


Abb. 8.

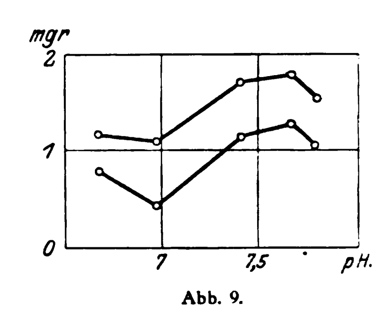


Abb. 9.

Das Pulver quillt in Wasser und Laugen kaum auf und setzt sich schnell zu Boden. In jedes Kölbchen kamen etwa 50 mg Pulver. Phosphatpuffer. Anfangs-Rest-N 1,03 mg, Tabelle XI, Abb. 8.

Tabelle XI.

	1	2	3
p_H, elektrometrisch . .	7,62	7,37	6,92
Rest-N, nach 73 Std. .	2,89	2,60	2,25
„ Zuwachs . . .	1,86	1,57	1,22
„ nach 121 Std. .	3,76	3,41	3,13
„ Zuwachs . . .	2,73	2,38	2,10

Dieser kleine Versuch zeigt, daß mit Aceton behandeltes Eiweiß an die Caseinlösung ein Ferment abgibt, das Casein in alkalischer Lösung zu spalten vermag. Da der Versuch jedoch nicht zeigt, bei welcher H-Ionenkonzentration das Maximum der Wirkung liegt, so wurden noch Versuche in dieser Richtung angestellt.

Versuch 13. Kaninchenleber, gut gewaschen. Die Aufschwemmung war 8 Tage bei 3° aufbewahrt. Bearbeitung wie im Versuch 12. Trockener Rückstand 0,3 g. Phosphatpuffer. Anfangs-Rest-N 1,10 mg. Tabelle XII. Abb. 9.

Tabelle XII.

	1	2	3	4	5
p_H, elektrometrisch . .	7,72	7,66	7,40	6,97	6,67
Rest-N nach 165 Std. .	2,15	2,36	2,22	1,53	1,87
„ Zuwachs . . .	1,05	1,26	1,12	0,43	0,77
„ nach 236 Std. .	2,62	2,86	2,80	2,19	2,26
„ Zuwachs . . .	1,52	1,76	1,70	1,09	1,16

Versuch 14. Dieselbe Leber. Bearbeitung wie früher. Phosphatpuffer. Anfangs-Rest-N 0,46 mg. Tabelle XIII, Abb. 10.

Tabelle XIII.

	1	2	3	4	5	6
p_H, elektrometrisch . .	8,22	7,90	7,71	7,46	7,07	6,70
Rest-N nach 217 Std. .	1,07	1,63	2,06	2,24	1,99	2,34
„ Zuwachs . . .	0,61	1,17	1,60	1,78	1,53	1,88

Die beiden letzten Versuche geben Aufschluß über die optimale H-Ionenkonzentration' des Ferments. In beiden Abb. 9 und 10 sieht man das Maximum der Kurve bei $p_H = 7,5$ bis 7,6 liegend, aber während die Kurve in der ersten Abbildung bei steigender Säuerung ziemlich schnell sinkt, um nach Übergang von $p_H = 7$ von neuem eine Steigerung zu zeigen wegen der Gegenwart eines in schwach saurem Milieu arbeitenden Ferments im Präparat, hatte die Kurve von Versuch 14 eine geringere Depression und darauf eine größere Steigerung als in Versuch 13. Dieser Unterschied im Verlauf beider Kurven ist wahrscheinlich durch das relative Mengenverhältnis der beiden Fermente in den Präparaten bedingt. Bei starker alkalischer Reaktion sind die Resultate beider Versuche ähnlich. Die Kurve sinkt sehr steil bei $p_H = 8,0$. Wenn wir diese Wirkung des mit Aceton bearbeiteten Niederschlags von Lebereiweiß mit der Wirkung unseres Filtrats vergleichen, so sehen wir, daß das Filtrat unter entsprechenden Bedingungen bedeutend stärker wirkt als der Niederschlag (unter den für ihn günstigen Bedingungen). Trotzdem gehen ins Filtrat nicht alle Leberfermente über. Offenbar hat das in schwach alkalischer Lösung arbeitende Ferment ein Arbeitsfeld, das keine intensive Arbeit verlangt, da es sich ständig unter fast optimalen Bedingungen befindet (wenn man nicht berücksichtigt, daß dieses Ferment bei meinen Versuchen durch die Bearbeitung mit

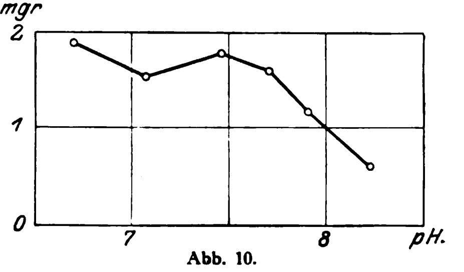


Abb. 10.

Aceton in seiner Wirkung geschwächt sein konnte). Umgekehrt sind die Fermente des Filtrats sehr aktiv und, wie es scheint, in der Leber in großer Menge vorhanden, sie spielen aber wahrscheinlich nur in den Fällen eine Rolle, wenn eine besonders schnelle Mobilisierung der Lebereiweißstoffe nötig ist, unter den Bedingungen des normalen Stoffwechsels aber ist ihre Wirkung durch die regulierende Wirkung der Reaktion des Substrats gehemmt.

Zusammenfassung.

1. Bei einem Säuregrad von $p_H = 4{,}7$ bis 5,0 scheidet eine Leberaufschwemmung etwa 70 Proz. seiner Eiweißstoffe aus, wobei die proteolytischen Fermente sich zwischen Filtrat und Niederschlag verteilen.

2. Bei der Einwirkung dieses Filtrats auf Casein findet man zwei ausgesprochene Maxima bei den Säuregraden $p_H = 5{,}2$ bis 5,4 und bei $p_H = 3{,}0$ bis 3,4 und ein ausgesprochenes Minimum zwischen ihnen, das vielleicht mit der isoelektrischen Zone des Caseins zusammenfällt.

3. Bei der Einwirkung auf Edestin zeigt sich ein deutliches Maximum bei $p_H = 4{,}0$; mit der Annäherung an den Neutralpunkt fällt die Spaltungskurve stark ab.

4. Die Wirkung auf Casein setzt bei $p_H = 7{,}5$ ein, bei stärker alkalischer Reaktion ist keine Spaltung des Caseins zu merken.

5. Der mit Aceton behandelte Lebereiweißniederschlag spaltet Casein in alkalischer Lösung, wobei das Maximum der Spaltung bei $p_H = 7{,}5$ bis 7,6 liegt.

6. Auf Grund dieser Beobachtung der Resultate *kann man drei auf Casein einwirkende proteolytische Fermente in der Leber annehmen.* Bei der Leberautolyse spielen wahrscheinlich alle drei Fermente eine Rolle, wobei die Autolysenkurve in ihrer Abhängigkeit vom Säuregrad die resultierende aus der Zusammenwirkung der drei Fermente und einer ganzen Reihe anderer Faktoren ist, von diesen ist der wichtigste der Dissoziationsgrad der Lebereiweißstoffe.

Zur Frage nach der Photosynthese der Kohlehydrate.

Von

M. J. Galwialo.

(Aus dem Laboratorium für physiologische Chemie an der militär-medizinischen Akademie zu Leningrad.)

(Eingegangen am 20. Februar 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Um die Frage nach der Photosynthese der Kohlehydrate zu lösen, werden zurzeit von vielen Forschern Untersuchungen angestellt, von *E. Baly*, *M. Heilbronn*, *W. Barker*, *W. Moore*, *G. Webster*, *I. Stoklasa* und anderen.

Im Jahre 1870 hat *Baeyer* als erster den Gedanken ausgesprochen, daß die Kohlensäure innerhalb der chlorophyllhaltigen Zelle in Kohlenoxyd und Sauerstoff dissoziiert wird. Der Sauerstoff wird in freiem Zustande ausgeschieden und das Kohlenoxyd, das zeitweilig mit dem Chlorophyll verknüpft ist, verbindet sich mit dem Wasserstoff und bildet ein Molekül Ameisenaldehyd: $CO + H_2 = H-C{}^{O}_{H}$. Aus diesem kann durch Kondensation Zucker entstehen. *Boehm* hat gezeigt, daß die ersten Versuche bei der Synthese mit Substanzen anzustellen sind, welche in genetischem Zusammenhange mit den Endprodukten der Assimilation, d. h. mit der Stärke, stehen, also mit Zuckerstoffen verschiedener Art.

Im Jahre 1883 hat *Boehm* seine Untersuchungen über die Bildung der Stärke aus künstlich bereiteten Zuckerlösungen veröffentlicht. Er nahm ätiolierte oder grüne, von der Stärke befreite Blätter des „Phaseolus multiflorus" und tauchte sie mit den Stielen in Rohrzucker- oder Glucoselösungen ein. Nach 24 Stunden konnte in den Blättern die Anwesenheit von Stärke, deren Menge von der Konzentration der Lösung abhing, festgestellt werden.

Meyer erhielt Stärke aus den Zuckerarten Mannit und Glycerin (vgl. *Meyer*, Bildung der Stärkekörner in den Laubblättern aus Zuckerarten Mannit und Glycerin). Gleichzeitig mit *Meyer* hat diese Tatsache der Umwandlung des Glycerins in Stärke durch höhere Pflanzen *Emile Laurent* beschrieben. *O. Loew* ging von der Annahme aus, daß sich die Zuckerstoffe durch Kondensation des Formaldehyds in den Pflanzen bilden, und suchte sie durch Polymerisation des Formaldehyds zu erhalten. Und wirklich erhielt er beim Kochen von Formaldehyd mit einem Gemisch von

granuliertem Zink und Zinn und dann mit Calciumoxydhydrat eine süß schmeckende Substanz, aber er konnte keine Stärke gewinnen.

Bokorny suchte die Möglichkeit der Stärkebildung durch niedere chlorophyllhaltige Organismen zu beweisen. Als Formaldehydquelle wandte er Methylal an in der Annahme, daß der Chlorophyllapparat ähnlich wie die Schwefelsäure diese Verbindung in Methylalkohol und Formaldehyd zu zerlegen imstande sein wird:

$$H_2C{<}^{OCH_3}_{OCH_3} + H_2O = HC{\lessgtr}^{O}_{H} + 2\,CH_3OH.$$

Der Versuch selbst wurde auf folgende Weise angestellt: Die von der Stärke befreite Spyrogyra — Sp. maxima und orthospina — wurde in bedeutender Menge in 2 ccm 0,1 proz. Lösung von Methylal in ein Gläschen von 15 ccm Inhalt gebracht. Das Gefäß wurde im Verlauf von 4 Stunden dem Sonnenlicht ausgesetzt; am Schluß des Versuchs befand sich in den Zellen eine beträchtliche Menge Stärke. Da die CO_2 der umgebenden Atmosphäre aus der Lösung sorgfältig entfernt wurde, so konnte sich die Stärke nur aus dem Methylal oder, besser gesagt, aus Formaldehyd bilden. Wie aus den angeführten Versuchen von *Bokorny* ersichtlich ist, findet sich in den grünen Blättern nicht nur eine Substanz, welche imstande ist, CO_2 in CO und O zu zerlegen und durch Anlagerung von Wasserstoff einen primären Aldehyd zu geben, sondern auch noch eine Substanz, welche letzteren zu Stärke polymerisiert.

P. P. Lasareff führt den Prozeß der Assimilation des Kohlenstoffs und seine Verteilung auf einzelne Stadien zurück. Die Kohlensäure zersetzt sich unter dem Einfluß des ultravioletten Lichtes nach der Formel: $2\,CO_2 = 2\,CO + O_2$. Diese Reaktionen sind umkehrbar und können in der einen oder der anderen Richtung verlaufen. Weiter können unter der Einwirkung der ultravioletten Strahlen die Wasserdämpfe in Wasserstoff und Sauerstoff nach der Formel: $2\,H_2O = 2\,H_2 + O_2$ zerfallen. Dann verläuft die Reaktion der Bildung des Ameisenaldehyds: $CO - H_2 = CH_2O$. Schließlich gibt letzterer die Polymerisationsprodukte $n(CH_2O) = C_n H_{2n} O_n$.

In den im Jahre 1914 veröffentlichten Arbeiten von *Moore* und *Webster* finden wir, daß die Autoren den Formaldehyd aus Kohlensäure und Wasser bei Gegenwart anorganischer Katalysatoren unter dem Einfluß des ultravioletten Lichtes erhielten. Als anorganische Katalysatoren wurden Chloreisen und salpetersaures Uranyl angewandt. Setzt man ein Quarz- oder Glasgefäß mit kohlensäuregesättigtem Wasser den Sonnenstrahlen, aber ohne Katalysatoren, aus, so erhält man keinen Formaldehyd und keinen Zucker.

Baly und *Heilbronn* stimmen mit *Moore* und *Webster* nicht überein und bemerken, daß man bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht den Formaldehyd bei lange dauerndem Durchleiten von Kohlensäure durch Wasser ohne jegliche Katalysatoren erhalten kann.

Weiter weisen *Baly*, *Heilbronn* und *Barker* darauf hin, daß die Synthese des Formaldehyds von der Wellenlänge der ultravioletten Strahlen abhängt.

Es ist wohl bekannt, daß die Kohlensäure die ultravioletten Strahlen von sehr kurzer Wellenlänge (200) absorbiert und der Formaldehyd etwas längere Wellen (290). Die Synthese muß daher in zwei Stadien verlaufen:

An erster Stelle Bildung des Formaldehyds und darauf seine Polymerisation. Daher müssen die oben genannten Katalysatoren, die von *Moore* und *Webster* bei der Photosynthese des Formaldehyds angewandt wurden, nach der Meinung von *Baly* und *Barker* für Beschützer oder Protektoren des gebildeten Formaldehyds gehalten werden. Nach ihren Beobachtungen absorbieren wirklich alle Protektoren die Strahlen, welche die Polymerisation des Formaldehyds hervorrufen. Nach der Meinung von *Baly*, *Heilbronn* und *Barker* verläuft der Prozeß der Synthese der Kohlehydrate in der lebenden Pflanze photokatalytisch. Als Photokatalysatoren dienen das Chlorophyll oder das Carotin. Die Reaktion besteht darin, daß das Chlorophyll oder das Carotin das Licht mit der Wellenlänge von 350 $\mu\mu$ und mehr absorbieren und dann die absorbierte Energie in Form von infraroten Strahlen emittieren, welche auf CO_2 und den Formaldehyd einwirken, weshalb die Bildung von Zucker zustande kommt.

In unserem Laboratorium werden die Arbeiten über den Chemismus der Photosynthese der Kohlehydrate seit 1910 ausgeführt.

Meine experimentellen Untersuchungen wurden nur in den ersten Sommermonaten angestellt, als sich in den jungen Laubblättern wieder Lebensprozesse abspielten.

Die Aufgabe meiner Untersuchungen bestand in folgendem: 1. die Funktion und die Rolle des Chlorophylls bei der Synthese der Kohlehydrate zu studieren; 2. jene Substanz oder jenes Ferment auszuscheiden, welches die Kohlehydrate synthetisiert; 3. klarzustellen, ob das Chlorophyll der grünen Blätter, Kohlensäure und Sonnenlicht allein genügen, oder ob noch andere Katalysatoren notwendig sind; 4. die Rolle der Wurzelfasern als eines Filters für die Salze aus der Erde festzustellen.

Für meine Arbeiten wandte ich den Mais, die Erbse, die türkische Bohne, die Kartoffel und die Birke an.

I. Untersuchungen mit dem aus den fünf genannten Pflanzen isolierten Chlorophyll.

Das Chlorophyll wurde mit Alkohol, Äther, Chloroform und Ammoniakwasser ausgezogen. Das nach allen diesen Operationen erhaltene Chlorophyll wurde auf seine synthetisierenden Eigenschaften hin untersucht. Kugelförmige Glasgefäße von 100 ccm Volumen wurden mit der Chlorophyllösung (0,2 auf 100,0 destillierten Wassers) angefüllt und mit Kohlensäure bei 4^0 C gesättigt.

Das vorher in Form einer dünnen Röhre ausgezogene Ende des Gefäßes wurde gleich nach der Sättigung zugeschmolzen. Das Gefäß wurde auf 2 Stunden den Sonnenstrahlen ausgesetzt. Darauf erfolgte das Öffnen und die Ausführung der Reaktionen auf Formaldehyd (Reaktion von *Marki*) und auf Zucker (*Trommer*sche Probe). Beide Reaktionen gaben in allen Fällen negative Resultate, was sowohl auf das Fehlen des Formaldehyds als auch des Zuckers hinweist.

II. Isolierung des Ferments aus chlorophyllhaltigen Zellen.

In seinem klassischen Werke über die Pflanzenphysiologie hat *J. Sachs* seine Beobachtungen über die Bildung der Stärke in den

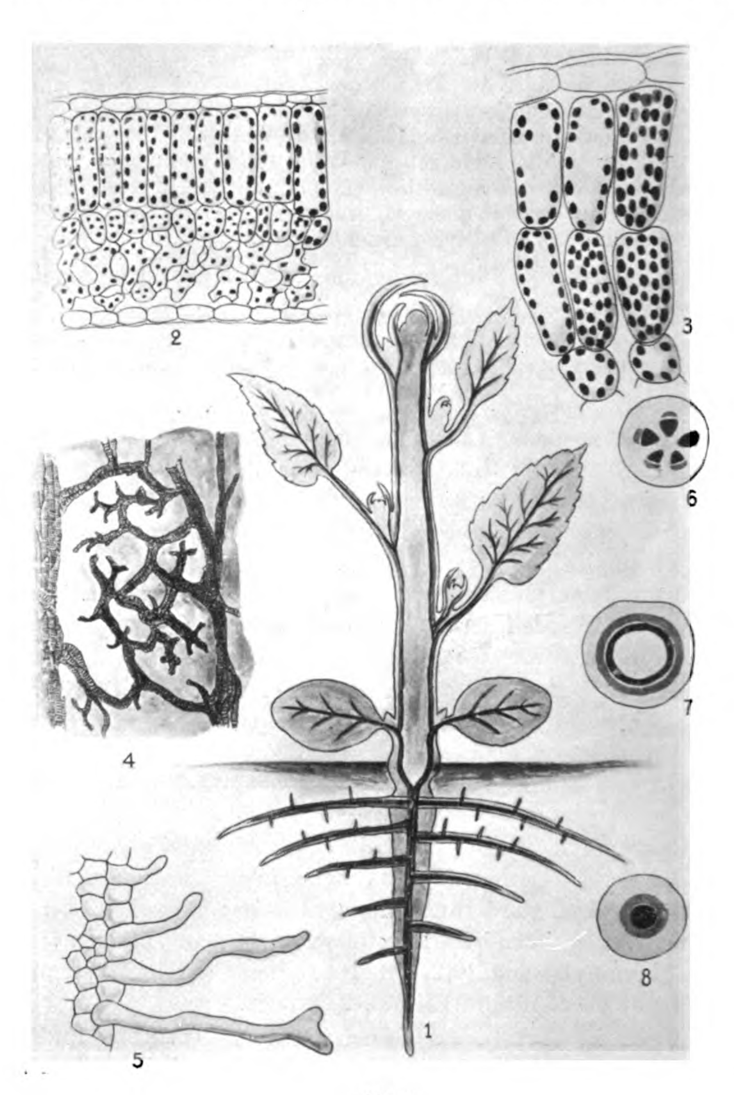


Abb. 1.

Chlorophyllkörnern (in den chlorophyllhaltigen Zellen) aus der Kohlensäure der Atmosphäre unter Zutritt der Luft beschrieben. Abb. 1, Verlauf der Bündel. Schema der Assimilation von CO_2 und Stärkebildung.

Stellt man in ein mit kohlensäuregesättigtem Wasser gefülltes Gefäß junge Sprößlinge und setzt sie den Sonnenstrahlen aus, so bildet sich bekanntlich sofort ein Strahl kleiner Gasbläschen, welche aus dem Querschnitt des Sprößlings emporsteigen. Stülpt man vorher über der Wasseroberfläche einen Glaszylinder, der mit Wasser gefüllt ist, auf, so kann man darin das sich ausscheidende Gas sammeln; es besteht hauptsächlich aus Sauerstoff und Spuren von Stickstoff und Kohlensäure.

Nimmt man nun Blätter, schneidet sie in kleine Stücke, legt sie in eine lange graduierte konische Röhre mit einer Erweiterung nach oben, bedeckt den unteren Teil mit Quecksilber und führt eine genau abgemessene Menge Kohlensäure ein, und bestimmt man nun nach zweistündigem Stehen die Kohlensäuremenge, so erweist sich, daß weniger Kohlensäure und mehr Sauerstoff gefunden wird. Bringt man aber die zerkleinerten Blätter in mit CO_2 gesättigtes Wasser und setzt sie den Sonnenstrahlen aus, so werden sich, wie dies oben erwähnt ist, energisch Gasbläschen ausscheiden.

Nach vielen Versuchen überzeugte ich mich, daß nach öfterem Wechsel des mit CO_2 gesättigten Wassers die Entwicklung der Blasen bald aufhört. Diese Tatsache weist darauf hin, daß, solange sich in den Blättern eine genügende Menge von Elektrolyten befindet, die Assimilation der CO_2 fortdauert; sobald nun ein Teil der Elektrolyte durch häufiges Wechseln des kohlensauren Wassers entfernt wird, hört die Assimilation auf. Somit kann die Synthese — die Assimilation — im Beisein von zwei Komponenten verlaufen: bei Anwesenheit der Substanz, die sich in der chlorophyllhaltigen Zelle befindet und im Beisein der Elektrolyte, die durch die Gefäßbündel aus den Wurzelfasern zugeführt werden. Sobald eine der genannten Komponenten auch nur zum Teil entfernt wird, hört die Assimilation auf.

In meinen Versuchen über die Isolierung des Ferments aus den chlorophyllhaltigen Zellen verfuhr ich auf folgende Weise. Ich nahm etwa 2,0 bis 5,0 g Laubblätter, die aus Samen auf einer Nährflüssigkeit oder einfach in der Erde gewachsen waren, legte sie in kohlensäurehaltiges Wasser und setzte sie 15 Minuten lang der Wirkung der Sonne aus. Diesen Versuch wiederholte ich so oft, bis sich weiter keine Gasbläschen entwickelten, d. h. so lange, bis man annehmen konnte, daß die Assimilation der Kohlensäure beendet war. Aber nun brauchte man zu diesen Blättern nur die aus den Wurzelfasern ausgeschiedenen Elektrolyte hinzuzufügen, damit die Assimilation, d. h. die Ausscheidung der Gasbläschen, wieder begann. Diese Tatsache überzeugte mich vollkommen davon, daß für die Kohlensäureassimilation zwei Substanzen: die Elektrolyte und das Ferment, notwendig sind. Andernfalls geht die Synthese nicht vonstatten. Wenn die Assimilation der

Kohlensäure durch die chlorophyllhaltigen Zellen aufhört, dann beginnt das Ferment in die Lösung überzugehen. Anscheinend besitzen die Elemente der chlorophyllhaltigen Zelle nicht mehr die Fähigkeit, das Kohlenoxyd zu binden, weil einige Elektrolyte fehlen, welche offensichtlich bei der Kohlensäuredissoziation eine große Rolle spielten. Sind sie nicht vorhanden, dann beginnt das Ferment, in die mit Kohlensäure gesättigte Lösung überzugehen.

Die Ausscheidung der Fermente.

Nach der Entfernung einiger Elektrolyte aus den Laubblättern wurden die Blätter in feine Lamellen zerkleinert, ins Wasser gelegt, bis 4° C abgekühlt und durch das Wasser Kohlensäure im Laufe von 30 Minuten geleitet. Die Flüssigkeit wurde von den Blättern abfiltriert und die Blätter auf eben dieselbe Weise noch zweimal behandelt. Die gesammelten Filtrate wurden in der Kälte in Gläsern mit angeschliffenen Glasstöpseln aufbewahrt. Auf die beschriebene Weise zog ich die Fermente aus allen fünf genannten Pflanzen aus.

Die gesammelten Filtrate wurden nach der angeführten Bearbeitung der Blätter im Vakuumapparat eingedampft und der erhaltene geringe Rest untersucht. Der Rückstand stellt eine organische Substanz mit geringem Gehalt an Stickstoff (*Lasseigne*sche Probe) dar.

III. Die Ausscheidung der Elektrolyte aus den Wurzelfasern.

Wir nahmen die Wurzelfasern von denselben Pflanzen, zerkleinerten sie im Mörser mit Kristallglas und veraschten im bedeckten Tiegel mit schwacher Flamme. Die veraschte Masse wurde mit Wasser ausgelaugt und durch eine Kollodiummembran dialysiert. Die gesammelten Dialysate bewahrten wir in gut verschlossenen Gläsern in der Kälte auf. Auf diese Weise erhielten wir die Elektrolyte aus allen fünf von uns angewandten Pflanzen.

Um die Fähigkeit des erhaltenen Ferments aus den chlorophyllhaltigen Zellen zur Photosynthese festzustellen, stellten wir folgende Versuche an.

Ein kugelförmiges Glasgefäß mit von zwei Seiten ausgezogenen Röhrchen wurde mit der aus den chlorophyllhaltigen Zellen erhaltenen Flüssigkeit angefüllt. Durch die Flüssigkeit wurde bei 4° C im Verlauf von 25 bis 40 Minuten Kohlensäure geleitet. Das Gefäß wurde zugeschmolzen und auf 5 Stunden den Sonnenstrahlen ausgesetzt. Nach dem Öffnen des Gefäßes wurde die Analyse ausgeführt (s. Tabelle I).

Derselbe Versuch wurde auch mit der aus den Wurzelfasern erhaltenen Flüssigkeit unternommen, um festzustellen, ob nicht die Elektrolyte der Wurzelfasern und das Sonnenlicht dazu genügen, um aus der Kohlensäure Formaldehyd oder Zucker zu erhalten, worauf

Tabelle I.

Pflanzenart	Menge der wässerigen fermenthaltigen Flüssigkeit	Elektrische Leitfähigkeit	Temperatur, bei welcher die elektr. Leitfähigkeit bestimmt wurde	Dauer der Kohlensäuredurchleitung	Temperatur der Kühlmischung, bei welcher die Sättigung mit CO_2 geschah	Dauer der Sonnenbestrahlung	Menge der verbrauchten *Fehling*schen Lösung in ccm	Zuckermenge in g	Zuckermenge in Proz.
1. Kartoffelblätter	50 ccm	$K = 9{,}4 \cdot 10^{-5}$	13,5° C	30 Min.	—4° C	5 Std.	—	—	—
2. Maisblätter	50	$K = 1{,}5 \cdot 10^{-4}$	13,5	30	—4	5	—	—	—
3. Erbsenblätter (junge) . .	50	$K = 4{,}4 \cdot 10^{-5}$	13,5	30	—4	5	—	—	—
4. Blätter d. türkischen Bohne	50	$K = 1{,}37 \cdot 10^{-4}$	13,5	30	—4	5	—	—	—
5. Blätter der jungen Birke .	100	$K = 1{,}35 \cdot 10^{-4}$	20	40	—4	6	—	—	—
6. Kontrolle	H_2O destillata 50 ccm	$K = 4 \cdot 10^{-6}$	13,5	30	—4	6	—	—	—
7. Kontrolle	H_2O communis 50 ccm	$K = 5{,}9 \cdot 10^{-5}$	13,5	30	—4	6	Geringfügige Reaktion	Spuren von Formaldehyd	

1 ccm *Fehling*scher Flüssigkeit entspricht 0,0018 g Glucose. Für die Titration nahmen wir bei allen Proben 5 ccm synthetisierte Flüssigkeit.

Tabelle II.

Pflanzenart	Menge der wässerigen elektrolytenhaltigen Flüssigkeit aus den Wurzelfasern	Elektrische Leitfähigkeit	Temperatur, bei welcher die elektr. Leitfähigkeit bestimmt wurde	Dauer der Kohlensäuredurchleitung	Temperatur der Kühlmischung, bei welcher die Sättigung mit CO_2 geschah	Dauer der Sonnenbestrahlung	Menge der verbrauchten *Fehling*schen Lösung in ccm	Zuckermenge in g	Zuckermenge in Proz.
1. Kartoffelwurzelfasern . . .	50 ccm	$K = 1{,}83 \cdot 10^{-3}$	13,5° C	30 Min.	—4° C	5 Std.	—	—	—
2. Maiswurzelfasern	50	$K = 1{,}06 \cdot 10^{-3}$	13,5	30	—4	5	—	—	—
3. Erbsenwurzelfasern	50	$K = 1{,}58 \cdot 10^{-3}$	13,5	30	—4	5	—	—	—
4. Wurzelfasern d. türk. Bohne	50	$K = 1{,}66 \cdot 10^{-3}$	13,5	30	—4	5	—	—	—
5. Wurzelfasern d. jung. Birke	100	$K = 2{,}68 \cdot 10^{-3}$	13,5	40	—4	6	—	—	—
6. Kontrolle	H_2O destillata 50 ccm	$K = 4 \cdot 10^{-6}$	13,5	40	—4	6	—	—	—

Tabelle III.

Pflanzenart	Menge der wässerigen fermenthaltigen Flüssigkeit aus Blättern und wässerige Flüssigkeit mit den Elektrolyten aus den Wurzelfasern	Dauer der Kohlensäuredurchleitung	Temperatur der Kühlmischung, bei welcher die Sättigung mit CO_2 geschah	Dauer der Sonnenbestrahlung	Menge der verbrauchten *Fehlings*chen Lösung in ccm auf 5 ccm der Lösung	Zuckermenge in g	Zuckermenge in Proz.	Reaktion auf Formaldehyd
1. Blätter u. Wurzelfasern der Kartoffel	50, 50 } 100 ccm	50 Min.	—4° C	6 Std.	7/20 ccm	0,00063	0,01226	fehlt
2. Blätter u. Wurzelfasern des Mais	50, 50 } 100	25	—4	6	8/20	0,00072	0,0144	„
3. Blätter u. Wurzelfasern der Erbse	50, 50 } 100	25	—4	6	12/20	0,00108	0,216	„
4. Blätter u. Wurzelfasern der türkischen Bohne	50, 50 } 100	25	—4	6	10/20	0,0009	0,018	„
5. Blätter u. Wurzelfasern der Birke	50, 50 } 100	25	—4	6	8/20	0,00072	0,0144	„

Elektrische Leitfähigkeit $K = 3{,}4 . 10^{-4}$ bei 13° C. Konzentration der H-Ionen $p_H = 8{,}77$ vor der Sättigung mit CO_2. Konzentration der H-Ionen nach der Sättigung mit CO_2 $p_H = 6{,}85$.

Moore und *Webster* hinweisen. Die Tabelle II zeigt, daß in einer solchen Lösung sich weder Formaldehyd noch Zucker bilden. Wenn man aber gleiche Volumina der Flüssigkeit mit dem Ferment aus den Blättern und der aus den Wurzelfasern gewonnenen Flüssigkeit vermischt, welche die Wurzelfaserelektrolyte enthält, in das kugelförmige Gefäß bringt und den Sonnenstrahlen im Laufe von 6 Stunden aussetzt, so kommt die Zuckersynthese zustande (vgl. Tabelle III).

Setzt man ein anderes Gefäß mit der auf dieselbe Weise behandelten Flüssigkeit dem Sonnenlicht auf längere Zeit — etwa 48 Stunden — aus, so verschwindet der Zucker. Nach der Untersuchung dieser Flüssigkeit auf Alkohol ergab sich kein Alkoholgehalt, eine Gärung fand also nicht statt. Weiter wurde eine Aussaat (auf Gelatine und Bouillon) unternommen, aber keine Mikroorganismen festgestellt. Nach dem Einengen dieser Flüssigkeit auf einem Wasserbade bleibt ein unbeträchtlicher Rest zurück. Unter dem Mikroskop sieht man runde punktförmige Gebilde, die sich mit Jod schwach blau

färben, aber nicht die Form von Stärkekörnern zeigen. Es scheint das zweite Stadium der Polymerisation, d. h. der Übergang des Zuckers in Stärke, erfolgt zu sein, aber die Stärkekörner haben sich nicht in genügender Weise formiert. Die angeführten Versuche zeigen, daß die Kohlehydratsynthese nicht so einfach verläuft, wie das *Baly*, *Heilbronn* und *Barker* behaupten.

Es genügt nicht, nur Wasser zu nehmen und Kohlensäure unter der Einwirkung des Sonnenlichts hindurchzuleiten, sondern es sind noch die Elektrolyte der Wurzelfasern dazu unerläßlich. *Moore* und *Webster* haben Recht, wenn sie darauf hinweisen, daß bei ihnen nicht einmal Formaldehyd bei der Einwirkung der ultravioletten und Sonnenstrahlen auf das kohlensäurehaltige Wasser gebildet worden ist.

Meine Versuche wurden nur in Glasgefäßen angestellt unter alleiniger Anwendung von Sonnenlicht. Auf diese Weise wurde die Versuchsflüssigkeit der Einwirkung aller Strahlen des Spektrums mit Ausnahme der ultravioletten ausgesetzt, welche teilweise durch das Glas des Gefäßes aufgehalten werden. *Baly*, *Heilbronn* und *Barker* schreiben der Wellenlänge der Lichtstrahlen eine große Bedeutung für die Photosynthese zu. Da sich aber die Vorgänge der Photosynthese auch in den Laubblättern der Pflanzen abspielen, die sich in den Treibhäusern unter Glas befinden, so halte ich es für völlig berechtigt, unter analogen Bedingungen zu arbeiten, d. h. sich des Sonnenlichts und der Glasgefäße zu bedienen.

Dem chemischen Prozeß der Photosynthese müssen wir meines Erachtens noch viel weiter auf den Grund gehen. Wir müssen unser Augenmerk auf die tote Natur lenken, aus dessen Reich die Wurzelfasern die seltensten Elemente filtrieren und durch die Gefäßbündel in die Werkstätte der grünen Laubblätter hinaufleiten.

W. Wernadski sagt, daß in der lebenden Substanz alle Elemente, die sich in der toten Natur finden, als Bestandteile auftreten. Wir müssen denken, daß in den Pflanzen weit mehr Elemente als Bestandteile vorkommen, als wir bisher wissen, und daß es möglich ist, daß für den Vorgang der Photosynthese irgendwelche spezifische Elektrolyte notwendig sind.

Stoklasa führt sehr interessante Versuche über die Wirkung des Radiums auf synthetische (Assimilations-) Prozesse in den Pflanzen an; diese Versuche haben die außerordentlich günstige Wirkung bestimmter Dosen der Emanation auf die Pflanzenernährung, auf die Anreicherung der Substanz in ihnen erwiesen. Wir wollen die Versuchsanordnung und die Ergebnisse eines von diesen Experimenten bringen:

Das Wachstum der Pflanzen geschah in Wasserkulturen, d. h. in wässerigen Lösungen der Nährsalze $Ca(NO_3)_2$, KH_2PO_4, KCl, $MgSO_4$. Das Wasser der Lösungen war in dem einen Falle gewöhnliches, d. h.

*

nicht radioaktiv, in den anderen Fällen ein radioaktives. Die Radioaktivität des Wassers war 300 M.-E. auf 1 Liter, in jedem Gefäß mit der Kultur hatte man im Wasser 96 M.-E. Die Wachstumsperiode umfaßte 46 vegetative Tage, von ihnen entwickelten sich die Pflanzen 18 Tage unter dem Einfluß der Emanation und in den übrigen 28 Tagen ohne dieselbe.

Das radioaktive Wasser wurde alle 5 Tage gewechselt, somit wirkten während der gesamten Vegetationsperiode auf die Pflanzen 384 M.-E. ein. Nach dem Ablauf der genannten 46tägigen Vegetationsperiode betrug bei zehn ganzen Pflanzen das Gewicht der gesamten trockenen Substanz:

	Im radioaktiven Wasser g	Im nicht radioaktiven H_2O g
Pisum Arvense	6,873	2,137
Vicia Faba	12,887	6,009
Lupinus Augustifol.	3,793	1,845
Hordeum distich.	9,075	0,906

Aus den angeführten Zahlen ersieht man, wie stark die Radiumemanation auf die Vegetation der Pflanzen wirkt. Wir müssen daran denken, daß nicht allein die Radiumemanation, sondern auch viele Elektrolyte, welche durch die Wurzelfasern aus der Erde geschöpft werden, sowohl in den Prozessen der Assimilation als auch des Wachstums der Pflanzen eine außerordentlich große Rolle spielen. Aus meinen Versuchen geht hervor, daß die Assimilation beim Fehlen gewisser Elektrolyte nicht vonstatten geht.

Auf Grund der erhaltenen Ergebnisse erlaube ich mir folgende Schlüsse zu ziehen:

1. Bei der Einwirkung des Sonnenlichts auf destilliertes Wasser, das mit Kohlensäure gesättigt ist, findet keine Synthese weder des Formaldehyds noch der Kohlehydrate statt.

2. Bei der Einwirkung des Sonnenlichts auf gewöhnliches CO_2-gesättigtes Wasser erhält man Spuren des Formaldehyds.

3. Das aus den chlorophyllhaltigen Zellen ausgeschiedene Ferment stellt eine organische Substanz dar.

4. Mit dem Ferment allein im mit Kohlensäure gesättigten Wasser erhält man bei der Einwirkung der Sonnenstrahlen weder Formaldehyd noch Kohlehydrate (Zucker).

5. Die Elektrolyte aus den Wurzelfasern synthetisieren im mit Kohlensäure gesättigten Wasser unter dem Einfluß des Sonnenlichts weder Formaldehyd noch Zucker.

6. Bei der Vermischung des Ferments aus den chlorophyllhaltigen Zellen und der Elektrolyte aus den Wurzelfasern bildet sich nach der

Sättigung mit Kohlensäure unter der Einwirkung des Sonnenlichts Zucker.

7. Setzt man ein Gefäß, in dem die Zuckersynthese zustande gekommen ist, 4 Tage lang der Sonne aus, so verschwindet der Zucker.

8. Nach der Verdampfung einer Flüssigkeitsportion, in welcher der Zucker verschwunden ist, erhält man einen geringen Rest. Unter dem Mikroskop sieht man runde Körnchen, welche sich mit Jod schwach blau färben.

Literatur.

Julius Sachs, Vorlesungen über Pflanzenphysiologie 1882, S. 358. — *Ad. Baeyer*, Ber. **3**, 1870. — *J. Boehm*, Landw. Versuchsst. **23**, 1879. — *Derselbe*. Bot. Zeitung 1883. — *E. Laurent*, ebendaselbst 1886, Nr. 8. — *Arthur Meyer*, ebendaselbst 1886. — *O. Loew*, Journ. f. prakt. Chem. **33**, 1886. — *Th. Bokorny*, Ber. d. deutsch. Bot. Ges. **6**, 1888. — *Baly*, Phil. Mag. (VI) **40**, 1, 15, 1920. — *Baly* and *Barker*, Journ. of chem. Soc. 1921, S. 653. — *B. Moore* and *T. A. Webster*, Proc. Roy. Soc. **87**, 163, 556, 1914; **90**, 168, 1918. — *W. I. Wernadski*, Die chemische Zusammensetzung der lebenden Substanz 1922. — *J. Stoklasa*, Strahlentherapie **4**, 1914. — *P. P. Lasareff*, Grundriß der Lehre über die chemische Wirkung des Lichts. Teil. **3**, 1920.

Jodzahlbestimmungen an Koprosterin.

Von

H. Dam.

(Aus dem physiologischen Laboratorium der Universität Kopenhagen.)

(Eingegangen am 2. März 1925.)

In einer früheren Mitteilung[1]) habe ich gezeigt, daß eine Jodzahlbestimmung an Cholesterin, nach *Winklers*, *Hanuš'* oder dem Pyridinsulfatdibromidverfahren und mit einem für jedes Verfahren charakteristischen Minimalhalogenüberschuß ausgeführt, zu ungefähr übereinstimmenden Werten führt, die um einige wenige Einheiten über der theoretischen Jodzahl 65,6 gelegen sind und bei einer Variation des Halogenüberschusses und der Reaktionszeit nur wenig verändert werden, während die drei am meisten angewandten Methoden, die von *Hübl*, *Waller* und *Wijs*, zu Zahlen führen, die von der theoretischen Jodzahl stark abweichen und bei *Wijs'* und *Wallers* Verfahren in hohem Grade vom Halogenüberschuß abhängen.

Es war danach von Interesse, zu untersuchen, wie das Koprosterin sich den drei Reagenzien gegenüber verhält, die mit Cholesterin einigermaßen brauchbare Resultate ergeben.

Das Koprosterin ist, wie bekannt, eine gesättigte Verbindung, und es wäre daher zu erwarten, daß es die Jodzahl 0 hätte.

Ida Smedley Mac Lean und *Ethel Mary Thomas*[2]) haben mit *Hübls* und *Wijs'* Reagenzien ein paar Jodzahlbestimmungen an Koprosterin angestellt und dabei die Werte: *Hübl* 23,8 und 9,3 und *Wijs* 33,2 und 18,2 gefunden.

Die im folgenden mitgeteilten Untersuchungen wurden an Koprosterin ausgeführt, das aus Menschenfäzes gewonnen und durch Fällen mit Digitonin, Spalten des Digitonins durch Extraktion mit Xylol in einem Soxhletapparat ohne Stöpsel, Abdestillation des Xylols

---

[1]) Diese Zeitschr. 152, 101.
[2]) Biochem. Journ. 15, 319, 1921.

in Dampfstrom und Umkristallisation des getrockneten Eindampfungsrestes aus Aceton, Essigäther, 80proz. Alkohol und Benzol, im ganzen neunmal, gereinigt worden war. Schmelzpunkt 115,4°, korrigiert.

Wegen der verhältnismäßig geringen zur Verfügung stehenden Menge des Stoffes wurde nur ein Zehntel von den Stoff- und Reagenzmengen angewandt, die man sonst benutzt, und die Titration wurde mit n/100 Thiosulfat ausgeführt. Die Bestimmungen fanden in 50-ccm-Meßkolben mit Glasstöpsel statt, und das Koprosterin wurde durch Abpipettierung einer Ätherlösung in die Kolben eingeführt, worauf der Äther durch Erwärmen und Durchleiten eines Luftstroms entfernt wurde.

Die Resultate waren:

1. Hanuš' Verfahren.

a) Variation der Koprosterinmenge.

Zu jeder Probe 1,50 ccm Reagens + 1 ccm $CHCl_3$. Reaktionszeit 15 Minuten.

Koprosterin g	Halogenüberschuß im Verhältnis zu derselben Gewichtsmenge Cholesterin Proz.	Jodzahl
0,0250	108,5	10,8
0,0125	317	11,9
0,00625	735	12,4

b) Variation der Zeit.

Dieselben Mengen Reagens und $CHCl_3$ wie oben. In jeder Probe 0,0125 g Koprosterin. Halogenüberschuß im Verhältnis zu derselben Gewichtsmenge Cholesterin 317 Proz.

Minuten	Jodzahl
10	10,0
15	11,9
30	12,2

2. Winklers Verfahren.

a) Variation der Koprosterinmenge.

Zu jeder Probe 1 ccm CCl_4 + 3 ccm etwa m/60 $KBrO_3$ + etwa 0,1 g festes KBr + 1 ccm 10proz. HCl. Reaktionszeit 1 Stunde.

Koprosterin g	Halogenüberschuß im Verhältnis zu derselben Gewichtsmenge Cholesterin Proz.	Jodzahl
0,0500	10,7	44,3
0,0375	47,6	48,2
0,0250	121	36,2
0,0125	343	31,6
0,00625	785	28,1

b) Variation der Zeit.

Dieselben Reagenzmengen wie oben. Zu jeder Probe 0,0250 g Koprosterin. Halogenüberschuß im Verhältnis zu derselben Gewichtsmenge Cholesterin 121 Proz.

Minuten	Jodzahl	Minuten	Jodzahl
15	14,2	85	47,0
45	33,9	115	70,9
60	36,2		

3. Das Pyridinsulfatdibromidverfahren.

a) Variation der Koprosterinmenge.

Zu jeder Probe 1 ccm $CHCl_3$ + 2 ccm Reagens. Reaktionszeit 5 Minuten.

Koprosterin g	Halogenüberschuß im Verhältnis zu derselben Gewichtsmenge Cholesterin Proz.	Jodzahl
0,0375	6,5	9,4
0,0250	40,2	9,5
0,0125	180	11,5
0,00625	465	12,1

b) Variation der Zeit.

Dieselbe Menge $CHCl_3$ und Reagens wie oben.

1. In jeder Probe 0,0250 g Koprosterin. Halogenüberschuß im Verhältnis zu derselben Gewichtsmenge Cholesterin 40,2 Proz.

Minuten	Jodzahl
2	9,0
5	9,5
10	10,6

2. In jeder Probe 0,00625 g Koprosterin. Halogenüberschuß im Verhältnis zu derselben Gewichtsmenge Cholesterin 453 Proz.

Minuten	Jodzahl
2	10,1
5	12,1
10	13,1

Man sieht, daß *Hanuš'* Verfahren und das Pyridinsulfatdibromidverfahren einigermaßen konstante und unter sich übereinstimmende Jodzahlen von etwa 10 ergeben, während *Winklers* Verfahren zu weit höheren Werten führt, die außerdem mit der Reaktionszeit stark wachsen und sonderbarerweise bei zunehmender Halogenmenge abnehmen, wenn diese eine gewisse Größe erreicht hat.

Wenn man an der Hand von Jodzahlen die Koprosterinmenge in einer Mischung von Koprosterin und Cholesterin bestimmen will, hat man entweder *Hanuš'* Verfahren oder das Pyridinsulfatdibromidverfahren zu benutzen. Von diesen beiden ist letzteres vorzuziehen, da man sich dabei, wie früher gezeigt, mit einem geringen Halogenüberschuß begnügen kann, während *Hanuš'* Verfahren einen Halogenüberschuß von mindestens 200 Proz. erfordert, um an Cholesterin konstante Jodzahlen zu ergeben.

Da ferner die gewöhnlichen Jodzahlreagenzien, von dem *Winkler*schen abgesehen, eine etwas variierende Zusammensetzung haben können und namentlich einer Veränderung beim Aufbewahren ausgesetzt sind, kann es zweckmäßig sein, gleichzeitig mit der Ausführung der Analyse selbst Kontrollbestimmungen an reinem Koprosterin und Cholesterin anzustellen.

Ein Beispiel einer solchen Analyse mittels des Pyridinsulfatdibromidverfahrens ist:

Cholesterin und Koprosterin wurden je für sich in Äther gelöst, und durch Abpipettieren und Abdampfen des Äthers wurden sechs verschiedene Proben von je 0,0250 g gewonnen, deren Koprosteringehalt von 0 bis 100 Proz. schwankte. Zu jeder Probe 1 ccm $CHCl_3$ + 2 ccm Reagens. Reaktionszeit 5 Minuten.

Aus der Jodzahl J wurde der Koprosterinprozentsatz x nach der Gleichung

$$\frac{x}{100} \cdot 8{,}4 + \frac{100 - x}{100} \cdot 67{,}3 = J$$

berechnet.

Koprosterin g	Cholesterin g	Jodzahl	Koprosterin vorhanden Proz.	Koprosterin aus der Jodzahl berechnet Proz.
0,0250	0	8,4	100	—
0,0200	0,0050	20,3	80	79,9
0,0150	0,0100	32,1	60	59,8
0,0100	0,0150	44,1	40	39,8
0,0050	0,0200	46,5	20	18,3
0	0,0250	67,3	0	—

Die Resultate sind befriedigend, man kann aber selbstverständlich bei kleinen Koprosterinprozenten nicht auf große relative Genauigkeit rechnen.

Inwiefern die Jodzahl sich auch zur Bestimmung der Menge von Koprosterin und eventuell β-Cholestanol in Mischungen mit Cholesterin und Phytosterinen anwenden läßt, wird den Gegenstand einer späteren Untersuchung bilden.

Zusammenfassung.

Hanuš' Verfahren und das Pyridinsulfatdibromidverfahren ergeben an Koprosterin einigermaßen konstante Jodzahlen (ungefähr 10).

Winklers Verfahren ergibt weit höhere Werte, die außerdem mit der Halogenmenge und der Reaktionszeit stark schwanken.

Mittels des Pyridinsulfatdibromidverfahrens kann man auf rein empirischer Grundlage den Koprosteringehalt einer Mischung von Koprosterin und Cholesterin bestimmen.

Beobachtungen über die hypoglykämischen Symptome bei Kühen.

Von

Erik M. P. Widmark und **Olof Carlens.**

(Aus dem medizinisch-chemischen Institut, Lund.)

(Eingegangen am 2. März 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Im Anschluß an unsere Versuche, den Symptomenkomplex der Geburtsparese bei Kühen als die Folgen einer Hypoglykämie zu erklären, haben wir unten geschilderte Versuche über die Wirkung des Insulins bei diesen Tieren ausgeführt. Wie bekannt, sind die Symptome, die bei Insulinvergiftung auftreten, bei verschiedenen Tierarten verschieden. Bei Kaninchen und Mäusen äußert sich die Insulinvergiftung in kräftig einsetzenden Krämpfen, die bis zum Eintritt des Todes andauern[1]). Beim Menschen und Hunde ist das Symptomenbild von anderer Art. Hier überwiegt der Komazustand, und nur äußerst selten hat man einen Krampfzustand beobachten können. Bei Kühen ist die Geburtsparese im vollkommen entwickelten Zustande durch ein Koma ohne irgendwelche Krämpfe gekennzeichnet. Ist unsere Theorie richtig, daß dieser Zustand durch einen Mangel an Glucose im Blute entsteht, so sollte man auch finden, daß die Wirkung des Insulins bei diesen Tieren zum gleichen Symptomenbild führt. Mit anderen Worten, die Versuche zielten darauf ab, festzustellen, ob die Insulinvergiftung bei Kühen sich als Krampf äußert oder nicht. Es ist dies ein Versuch, den Symptomenkomplex der Geburtsparese auf künstlichem Wege hervorzurufen.

Diese Versuche konnten unter besonders günstigen Umständen durchgeführt werden. Dem Vorstand der Insulinfabrik in Kopenhagen, Dr. med. *H. C. Hagedorn,* sind wir für das unentgeltliche Überlassen von 5000 Einheiten Insulin zu Dank verpflichtet. Ferner haben wir von der „Kungliga Medicinalstyrelsen“ die Erlaubnis erhalten, unsere

---

[1]) Wie wir uns durch vor kurzem ausgeführte Versuche überzeugen konnten, treten auch bei Schweinen Krämpfe auf.

Versuche an Kühen auszuführen, die auf Grund der herrschenden Maul- und Klauenseuche zur Schlachtung bestimmt gewesen sind. Hierdurch hat uns ein erheblich umfangreicheres Versuchsmaterial zur Verfügung gestellt werden können, als unter normalen Verhältnissen möglich gewesen wäre.

Einige vorbereitende Versuche wurden im Schlachthaus zu Malmö ausgeführt, wo zwei ungefähr 600 kg schwere Kühe 600 bzw. 400 Leo-Einheiten Insulin erhielten. Leider konnte die Beobachtung der Tiere nicht länger als ungefähr 2 Stunden fortgesetzt werden, da diese unmittelbar geschlachtet werden sollten. Die Versuche zeigen jedoch, daß diese Insulinquantitäten eine deutliche Herabsetzung des Blutzuckergehalts bewirkten, was ungefähr 1 Stunde nach der Injektion zu bemerken war. Bei den niedrigsten Blutzuckerkonzentrationen, 0,053 und 0,043 Proz., konnten keine hypoglykämischen Symptome beobachtet werden. Die erhaltenen Blutzuckerwerte sind in den Tabellen I und II wiedergegeben.

Tabelle I.

12. Januar 1925. Nr. 53. Stark milchgebende Kuh der schwarzscheckigen schwedischen Niederungsrasse. Erhielt subkutan 400 „Leo"-Einheiten Insulin.

Zeit nach der Injektion	Blutzuckerkonzentration Proz.	Bemerkungen	Zeit nach der Injektion	Blutzuckerkonzentration Proz.	Bemerkungen
3′	0,075		69′	—	Temp. 38,6°
20	—	Temp. 39,2°	91	0,043	
30	0,075		107	—	Temp. 38,4°
62	0,060		112	0,045	

Tabelle II.

12. Januar 1925. Nr. 88. Stark milchgebende Kuh der schwarzscheckigen schwedischen Niederungsrasse. Erhielt subkutan 600 „Leo"-Einheiten Insulin.

Zeit nach der Injektion	Blutzuckerkonzentration Proz.	Bemerkungen	Zeit nach der Injektion	Blutzuckerkonzentration Proz.	Bemerkungen
Vorher	0,073		61′	0,070	
8′	—	Temp. 39,0°	90	0,063	
30	0,074		98	—	Temp. 38,2°
60	—	Temp. 38,4°	101	0,054	

Die Versuche wurden später auf einem Landgut fortgesetzt; dort wurden fünf Tieren etwa 6 Stunden nach der letzten Fütterung wechselnde Mengen Insulin subkutan injiziert. Zwei derselben erhielten je 500 Leo-Einheiten. Ein Tier erhielt 400, ein anderes 300 und das letzte schließlich 200 Einheiten. Die Zeit ließ es nicht zu, die Veränderungen der Blutzuckerkonzentration an mehr als zwei der Tiere

genauer zu verfolgen, nämlich an Broga mit 500 Einheiten und an Lina mit 400 Einheiten. Außerdem wurde eine Blutzuckerbestimmung an Blända ausgeführt, die 200 Einheiten erhalten hatte. Die Bestimmung wurde vorgenommen, sobald die hypoglykämischen Symptome ihren Höhepunkt erreicht hatten[1]). Die Veränderungen des Blutzuckergehalts, die in den Tabelle III und IV für Broga und Lina wiedergegeben werden, zeigen auch hier eine deutliche Wirkung der Insulininjektion. Deutliche äußere Symptome der Insulinwirkung wurden nur an zwei Fällen beobachtet, nämlich an Broga und Blända. Die letztere hatte nur 200, die erstere 500 Einheiten erhalten.

Tabelle III. Broga.

Zeit	Blutzuckerkonzentration Proz.	Bemerkungen	Zeit	Blutzuckerkonzentration Proz.	Bemerkungen
12h30′	0,084	Temp. 38,3°	4h45′	0,030	
12h30′–12h35′	—	500 Einh. Insulin	5 17	—	Lufteinblasung
1h35′	0,041		5 25	—	Temp. 38,2°
2 40	0,038		5 35	—	Vollständ. Koma
2 45	—	Temp. 38,3°	5 50	0,047	
3 50	0,030		6 10	—	Einige spontane Bewegungen
3 55	—	Wackelt			
4 10	—	Fällt nieder	6 37	0,048	

Tabelle IV. Lina.

Zeit	Blutzuckerkonzentration Proz.	Bemerkungen	Zeit	Blutzuckerkonzentration Proz.	Bemerkungen
12h40′	0,076	Temp. 38,3°	3h55′	0,044	
12h40–12h45′	—	400 Einh. Insulin	4 55	0,057	
1h40′	0,052		5 55	0,062	
2 45	0,049	Temp. 38,2°			

Die Entwicklung des Symptomenbildes bei diesen zwei Tieren war die folgende:

Broga: 3 Stunden nach der subkutanen Injektion von 500 Einheiten Insulin beobachtete man am Tiere eine nach vorn strebende Bewegung, so daß es unter den Baum vorzudringen versuchte, der das Tier vom gemeinsamen Futtergang trennte. Es mußte mit einem Strick hiervon zurückgehalten werden. Nach 3 Stunden 25 Minuten begann das Tier langsam zu wackeln. 15 Minuten später fiel das Tier spontan nieder und lag anfangs mit erhobenem Kopfe. Nachher wurde beobachtet, daß es den Kopf wiederholte Male seitwärts und rückwärts

[1]) Bestimmungen nach der Mikromethode von *Bang*. Blut aus den Ohrvenen.

gegen den Bug wendete und diese Stellung während längerer Zeit beibehielt; genannte Stellung ist für die Geburtsparese charakteristisch. Nach abermaligem Verlauf einiger Zeit legte sich das Tier ganz auf die Seite und streckte Kopf und Hals gegen den Boden. Nun konnte es den Kopf nicht mehr vom Boden erheben. Irgendwelche Spuren von Krämpfen konnten nicht beobachtet werden. Dieser Zustand dauerte bis zur Schlachtung, ungefähr 19 Stunden nach der Injektion. 5 Stunden 17 Minuten nach Ausführung der Injektion wurde Luft in das Euter eingeblasen, doch ohne irgendwelchen Erfolg.

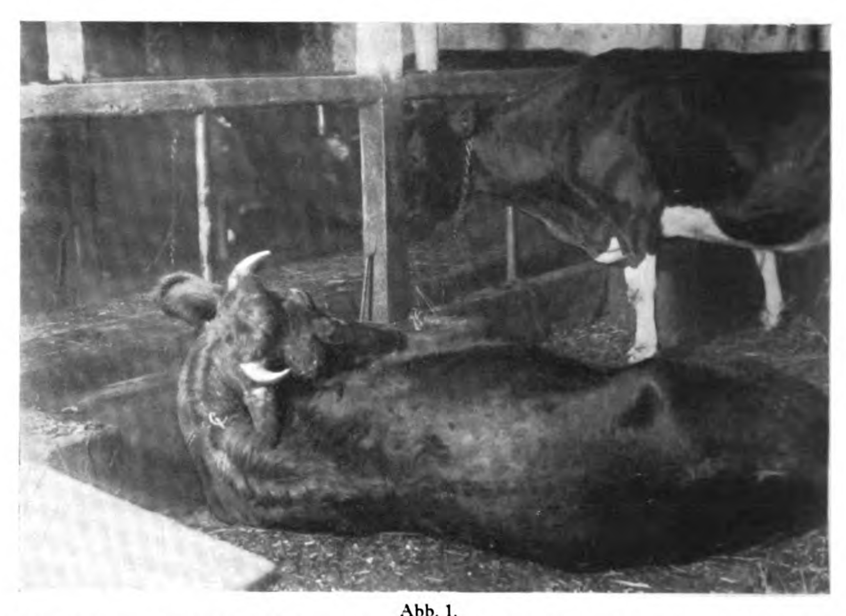


Abb. 1.
Liegend: *Broga* nach einer subkutanen Injektion von 500 Leo-Einheiten Insulin. Niedrigste Blutzuckerkonzentration 0,030 Proz. Man beachte die bei Geburtsparese typische Kopfstellung. **Stehend dahinter**: *Lina* nach einer Gabe von 400 Einheiten Insulin. Niedrigste Blutzuckerkonzentration 0,044 Proz.

Als die hypoglykämischen Symptome aufzutreten begannen, war der Blutzuckergehalt, wie sich aus der Tabelle ergibt, von 0,084 auf 0,030 Proz. gesunken. Nach 5 Stunden 50 Minuten begann bereits eine deutliche Erhöhung des Blutzuckergehalts einzutreten, die Wirkung des Insulins begann also abzuklingen, der Komazustand blieb jedoch auch nach diesem Ansteigen des Blutzuckergehalts bestehen. Das Bild zeigt das Tier mit der typischen Kopfstellung.

Blända, die nur 200 Einheiten erhalten hatte, verhielt sich auf ungefähr die gleiche Weise wie das obige Tier. Es war vielleicht noch schwieriger, dieses Tier daran zu hindern, die Beine nach vorn in den

Mittelgang zu strecken. Zuerst ging es in die Knie, soweit nach vorn als möglich, streckte die hinteren Extremitäten nach rückwärts und nach 3 Stunden legte sich das Tier und konnte nun nicht mehr zum Erheben gebracht werden. Die Konzentration im Blute betrug hierbei 0,037 Proz. Allmählich entwickelte sich auch bei diesem Tiere ein vollständiges Koma, welches bis zur Schlachtung, etwa 14 Stunden nach der Injektion, andauerte. Während der Zeit, da wir das Tier beobachteten, konnte keinerlei Krampfsymptom bemerkt werden, doch wurde uns mitgeteilt, daß das Tier später während der Nacht eine gewisse Steifheit der vorderen Extremitäten gezeigt haben soll.

Das im Bilde im Hintergrund stehende Tier, *Lina*, erhielt 400 Einheiten. Die Veränderungen in der Blutzuckerkonzentration ergeben sich aus Tabelle IV. Der Blutzuckergehalt sank von 0,076 bis auf 0,044 Proz., was nach 3 Stunden und 15 Minuten eintraf. Irgendwelche anderen hypoglykämischen Symptome konnten am Tiere nicht beobachtet werden.

Aus früher ausgeführten Bestimmungen des Blutzuckergehalts an normalen Kühen geht hervor, daß noch bei einer so niedrigen Blutzuckerkonzentration wie 0,05 bis 0,04 Proz. keine hypoglykämischen Symptome auftreten. Bei einem von uns früher untersuchten Viehbestand, der nur mit Zuckerrübenblättern gefüttert wurde[1]), lagen ungefähr 30 Proz. sämtlicher Blutzuckerbestimmungen zwischen den eben angegebenen Werten. Die hypoglykämischen Symptome, die jetzt beobachtet wurden, traten in einem Falle mit einer Blutzuckerkonzentration von 0,030 und in einem anderen Falle bei einer Konzentration von 0,037 Proz. auf. Hieraus ergibt sich, daß die Herabsetzung des Blutzuckergehalts, die bei Kühen hypoglykämische Symptome hervorruft, oft nur ganz unbedeutend zu sein braucht. Während beim Menschen der normale Blutzuckergehalt auf ungefähr die Hälfte, oder von 0,10 bis 0,08 auf 0,05 bis 0,04 Proz. vermindert werden muß, bedarf es bei stark milchgebenden Tieren mitunter nur einer Herabsetzung von 0,04 auf 0,03 oder weniger, um die hypoglykämischen Symptome hervorzurufen. Hieraus geht des weiteren hervor, in welcher empfindlichen Situation sich diese Tiere hinsichtlich der Regulierung der Blutzuckerkonzentration befinden.

Zusammenfassung.

1. In zwei Fällen wurden durch subkutane Injektion von 500 bzw. 200 „Leo“-Einheiten Insulin hypoglykämische Symptome an Kühen hervorgerufen. In diesen Fällen betrugen die niedrigsten beobachteten Blutzuckerkonzentrationen bzw. 0,030 und 0,037 Proz. Die

[1]) Diese Zeitschr. 1925.

hypoglykämischen Symptome bestehen in einer allmählich auftretenden Erlahmung und Bewußtlosigkeit, die von der gleichen Art zu sein scheinen wie die hypoglykämischen Symptome, die an Hunden und Menschen auftreten. Krämpfe kamen nicht vor. Das Symptomenbild erinnert in seinen Einzelheiten an den Symptomenkomplex der Geburtsparese.

2. Da der Blutzuckergehalt schon bei normalen, stark milchgebenden Kühen oft auf 0,04 Proz. sinken kann und die beobachteten hypoglykämischen Symptome bereits zwischen 0,04 und 0,03 Proz. aufgetreten sind, ergibt sich, daß die Herabsetzung, die zur Hervorrufung der hypoglykämischen Symptome erforderlich ist, eine sehr unbedeutende und verhältnismäßig viel geringere als beim Menschen ist.

Untersuchungen über Diastase.

I. Mitteilung:
Über die Nichteinheitlichkeit der Gerstenmalzdiastase.

Von

Viktor Syniewski.

(Aus dem gärungschemischen und mykologischen Institut der Technischen Hochschule in Lemberg.)

(Eingegangen am 2. März 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Den Prozeß, welchen Diastase, auf Stärke einwirkend, auslöst, nannten die ersten Chemiker, die sich damit befaßten, übereinstimmend mit den Praktikern der Gärungsgewerbe einfach „Verzuckerung", weil dabei eine süße Substanz, also wohl Zucker, so folgerte man, entstand. Da hier nun von *einem* Verzuckerungsprozeß die Rede war, ist es selbstverständlich, daß man damals unter Diastase auch nur eine einzige Substanz verstand. Wenn hier und da, besonders von Praktikern, abweichende Ansichten verlautbart wurden, so wurden sie ohne genügende Begründung in die Welt geschickt.

So stand die Angelegenheit bis zum Jahre 1877, in welchem *Maercker* in seinem bekannten Handbuch der Spiritusfabrikation die aus der Brennereipraxis längst bekannte Tatsache in der Literatur festlegte, daß dem Malze außer der „verzuckernden" Kraft auch eine sogenannte „stärkeverflüssigende" innewohne; hierbei dachte man aber noch an *nur eine* Diastase als den Träger dieser beiden Kräfte. Fünf Jahre später aber (1882) veröffentlichten *Dubrunfaut* und *Cuisinier*[1]) ihre Theorie über das Vorhandensein *zweier* Enzyme in der Diastase, nämlich ihrer Dextrinase, die dextrinbildend, also „verflüssigend" wirke, und ihrer Maltase, die sich „verzuckernd" betätige. In dieser zum erstenmal auftauchenden „Zweienzymtheorie" kennen die angeführten Autoren noch immer nur *ein einziges* „verzuckerndes" Enzym, die damalige Maltase.

Auf die erste Spur, daß es *zwei* verzuckernde Enzyme gebe, kommt erst *Lintner*[2]), und zwar im Jahre 1887; Gewißheit aber erlangt er darüber (mit *Eckhardt*) erst in den Jahren 1889 bis 1890[3]). Eins dieser verzuckernden Enzyme ist in der Gerste vorhanden, das andere in dem aus diesem Getreide

[1]) Mémoire sur la saccharif. des fécules. Paris 1882, S. 140.
[2]) Studien über Diastase. Journ. f. prakt. Chem., N.F., **36**, 481.
[3]) Ebendaselbst **41**, 91.

dargestellten Malze. Was die Art des hervorgerufenen Prozesses anbelangt, sind sich, nach diesem Forscher, beide Enzyme gleich: Sie verzuckern Stärke so, daß neben Dextrinen Maltose entsteht. Verschieden sind sie nur darin, daß ihr Wirkungsoptimum bei verschiedenen Temperaturen liegt. Kurz darauf (1890) bestätigen *Brown* und *Morris*[1]) den Befund *Lintners* und finden außerdem, daß die beiden Enzyme gelöste Stärke zwar gleichartig verzuckern, auf ungelöste Stärkekörner jedoch, und zwar äußerlich, verschieden wirken: Gerstendiastase verzuckert die Körner langsam ohne Korrosion, Malzdiastase aber korrodiert dieselben hierbei so, daß sie mit der Zeit zerbröckeln. Diese Forscher geben der Gerstendiastase den Namen Translokationsdiastase, und Malzdiastase benennen sie Sekretionsdiastase.

Die Theorie *Lintners* sowie die von *Brown* und *Morris* sind somit, wenn von *Malz*diastase die Rede sein soll, eigentlich „Einenzymtheorien", da sie im Malze nur ein einziges „verzuckerndes" Enzym anerkennen: das andere ist in der Gerste vorhanden. Aber auch die Zweienzymtheorie *Dubrunfaut* und *Cuisiniers* ist, wenn von „*verzuckernden*" Enzymen zu sprechen ist, ebenfalls nur eine Einenzymtheorie; das andere Enzym, das sie in der Malzdiastase annehmen, ist bloß ein „verflüssigendes".

Der *Dubrunfaut* und *Cuisinier*schen ähnliche, aber einer richtigen Zweienzymtheorie bedeutend nähere Ansichten vertreten später *Wijsmann*[2]) und *Beijerinck*[3]). *Wijsmann* benennt eines seiner Enzyme ebenfalls Maltase, das andere Dextrinase, also ebenso wie *Dubrunfaut* und *Cuisinier*, nur ist bei *Wijsmann* die Wirkungsweise dieser Enzyme gerade umgekehrt wie bei den letzteren Autoren. Diese Wirkungsweise veranschaulicht der letztere Forscher durch nachfolgendes Schema:

Stärke wird umgewandelt durch

Maltase in	*Dextrinase* in
Maltose und *Erythrogranulose*, welche durch Einwirkung von *Dextrinase* zu *Leukodextrin* wird.	*Maltodextrin*, welches durch Einwirkung von *Maltase* zu *Maltose* wird.

Maltase ist nach *Wijsmann* bereits im rohen Gerstenkorn vorhanden, Dextrinase aber erst im gemälzten, aus dem es von Maltase befreit erhalten wird durch Erhitzen des Malzauszuges auf 75°.

Die Theorie *Wijsmanns* ist eine Verschmelzung der Theorien *Lintners* bzw. *Browns* mit der *Dubrunfaut* und *Cuisinier*schen. Freilich ist *Wijsmann* selbständig zu ihr gekommen; hat er sie doch in demselben Jahre (1890) veröffentlicht, wie *Lintner* die seinige. Die *Wijsmann*sche Theorie kam unzweifelhaft (was aus dem Späteren zu ersehen sein wird) der Wahrheit viel näher, als die vorher genannten, jede für sich, hatte aber leider keinen durchschlagenden Erfolg, sowohl wegen der Schwächen in der Beweisführung[4]) als auch im besonderen deshalb, weil

---

[1]) Researches on the germination of some of the Gramineae, Journ. Chem. Soc. **57**, 493.

[2]) La diastase consid. comme un melange de maltase et de dextrinase. Recueil des travaux chimiques des Pays-Bas. **9**, 1.

[3]) Centralbl. f. Bakt., II. Abt., **1**, 265.

[4]) Siehe z. B. *Green*, Die Enzyme (übersetzt von *Windisch*), S. 62. Berlin 1901.

nach ihr das Endresultat der Verzuckerung der Stärke je nach der Reihenfolge der Einwirkung der beiden von ihm angenommenen Enzyme verschieden ausfallen müßte, was mit den schon damals bekannten Beobachtungen über den tatsächlichen Verlauf der Stärkeverzuckerung nicht zur Übereinstimmung zu bringen war. *Beijerinck*[1]) warf *Wijsmann* besonders noch vor, daß des letzteren Dextrinase, die durch Erhitzen des Malzauszuges erhalten wurde, ein hierbei erhaltenes Kunstprodukt sei. Er änderte, verbessernd, wie er meinte, die *Wijsmann*sche Theorie, indem er das Vorhandensein der Dextrinase nicht anerkannte und an Stelle dieses Enzyms neben Maltase die Existenz eines anderen, wirklichen, natürlichen Enzyms, von ihm Granulase genannt, annahm, und dem er auch eine andere Wirkungsweise zuschrieb.

Daß diese mehr oder weniger geistreichen Theorien über die Nichteinheitlichkeit der Malzdiastase einen allgemein durchschlagenden Erfolg in der Tat nicht hatten, beweisen weitere Arbeiten auf diesem Gebiete, besonders z. B. die *Osbornes*[2]) und *Wroblewskis*[3]), welche Forscher die Möglichkeit des Vorkommens zweier diastatischer Enzyme im Malze wohl ignorierten, da sonst ihre Arbeiten über die „chemische Zusammensetzung" und den „chemischen Charakter" der Diastase zwecklos gewesen wären und keinen Sinn gehabt hätten.

Den Glauben an die Zusammengesetztheit der Malzdiastase ließen aber nicht alle Chemiker fallen; es fanden sich immer welche, die weitere Anstrengungen in dieser Materie machten. Einen meiner Ansicht nach sehr rationellen und höchst originellen Weg zum wenigstens qualitativen Nachweise, daß es im Malze zwei oder mehr diastatische Enzyme gebe, betrat *Seyffert* (1898)[4]), der schließlich zu der Überzeugung gelangte, daß am Stärkeabbau mindestens drei Enzyme beteiligt sind, ohne aber leider weder etwas Näheres über die Art dieser Enzyme, noch etwas Genaueres über ihre Wirkungsweise zeigen zu können.

Aus obiger stark gekürzten Darstellung des historischen Hergangs unserer Vorstellungen über die Einheitlichkeit bzw. Zusammengesetztheit der Malzdiastase ist zu ersehen, *daß diese Frage trotz vieler, zumeist auch hervorragender Arbeiten auf diesem Gebiete noch nicht vollkommen gelöst worden ist.* Als Ergebnis der bisher veröffentlichten Untersuchungen über dieses Thema steht zwar eines fest, nämlich, daß jenes Agens aus Gerstenmalz, das die Hydrolyse der Stärke katalysiert, nicht einheitlich ist, sondern aus mindestens zwei, wenn nicht drei Enzymen besteht, aber darüber hinaus, und zwar sowohl über die Art der Komponenten der Gesamtdiastase, als auch darüber, was für Prozesse es sind, welche jede von ihnen auslöst — denn „Verflüssigung" und „Verzuckerung" sind doch zu allgemein gehaltene

---

[1]) l. c.

[2]) Chem. Natur der Diastase, Chem. Ber. **29**, 1159; Amer. Chem. Soc. **18**.

[3]) Über die chemische Beschaffenheit der Diastase, Zeitschr. f. physiol. Chem. **24**, 173.

[4]) Untersuchungen über Gerstenmalzdiastase, Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, **21**, 195 und 611; siehe auch meine Abhandlung in Liebigs Ann. **309**, 300.

*

Begriffe —, gehen die Meinungen der einzelnen Forscher stark auseinander. Dies wird man auch ganz natürlich finden, wenn man bedenkt, daß die Enzyme bis jetzt überhaupt noch immer nur dann als verschieden erkannt und anerkannt werden, wenn man sie entweder spezifisch nur auf chemisch verschiedene Substrate wirken sieht, oder aber, wenn man bei ihrer Einwirkung auf ein und dasselbe Substrat die hierbei entstehenden Zersetzungsprodukte als verschieden zu unterscheiden versteht, wir aber unsere Diastase zwar als nur auf Stärke einwirkend kennen, jedoch die Stärkesubstanz selbst und besonders die aus ihr durch diastatische Einwirkung entstehenden Produkte trotz einer Unzahl von Untersuchungen bisher noch zu unvollkommen kannten, um sie genau zu unterscheiden zu verstehen und darauf eine Vorstellung darüber gründen zu dürfen, ob das betreffende diastatische Präparat diese oder jene Diastase vorstellt, bzw. ob es einheitlich oder zusammengesetzt ist.

Die jeweiligen Vorstellungen über die Zusammensetzung der Stärkekörner und den Bau der Stärkesubstanz sowie der Produkte der diastatischen Hydrolyse der letzteren übten auch immer eine Rückwirkung auf die Vorstellung über die Diastase aus. Als letztes Beispiel des oben Gesagten diene die Theorie *Maquennes*[1]). Dieser Forscher kam auf Grund einiger Experimente zu der Ansicht, daß die Stärkekörner aus zwei, nach ihm wohl unterscheidbaren Substanzen bestehen, nämlich aus etwa 80 Proz. der sogenannten Amylose und aus 20 Proz. Amylopectin. Nach ihm ist Amylose in kochendem Wasser löslich, Amylopectin quillt aber darin nur zu Kleister auf; Amylose kann durch Diastase weitgehend, und zwar bis zu 100 Proz., in Maltose umgewandelt werden, Amylopectin aber nur in Dextrin. Diese Vorstellung über die Zusammensetzung der Stärkekörner hat bei *Maquenne* gleich eine entsprechende Meinung über die Komponenten der Diastase hervorgerufen: Auf Amylose verzuckernd wirkt nach diesem Forscher Amylase, auf Amylopectin aber ein anderes Enzym, die Amylopectinase. Wie aber *Maquenne* Amylopectin von Amylose noch nicht getrennt hat[2]), ebensowenig wird er auch wohl eine Amylopectinase von Amylase trennen können bzw. zu unterscheiden verstehen, und in dem Augenblick, in welchem seine Theorie[2]) über die Zusammensetzung der Stärkekornsubstanz fallen wird, wird auch seine Amylopectinase mit der Amylase zusammen wieder zu Diastase werden, und zwar zur Diastase *Payens* und *Persoz'* aus dem Jahre 1833. Bevor wir nicht reines Amylopectin und reine Amylose sicher in Händen haben und nicht gezeigt wird, daß ein diastatisches Präparat nur auf Amylopectin

---

[1]) Recherches sur l'amidon et sa saccharification diastasique. Ann. d. Chim. et de Phys. 8., série IX. p. 179.

[2]) l. c., S. 216.

einwirkt, das andere aber nur auf Amylose, solange wird man an Amylopectinase bzw. an Amylase im Sinne *Maquennes* kaum glauben dürfen.

Die enzymatischen Komponenten der zusammengesetzten Diastasepräparate bzw. ihrer Lösungen müssen also vorerst voneinander getrennt werden, wenn man sie und ihre Wirkungsweise auf Stärke näher kennenlernen will.

Einen viel verheißenden Weg in dieser Richtung schienen *Fränkel* und *Hamburg*[1]) eingeschlagen zu haben.

Schon *Wijsmann*[2]) und *Grüss*[3]) schrieben den beiden, von ihnen in der Diastase angenommenen diastatischen Enzymen verschiedenes Diffusionsvermögen zu, und *Fränkel* und *Hamburg* versuchten diese Eigenschaft zur Trennung jener Enzyme auszunutzen. Dies gelang ihnen jedoch bis jetzt leider nur zum Teil. Sie dialysierten ihre anscheinend schon ziemlich reinen Diastaselösungen gegen gekochtes Brunnenwasser, und es zeigte sich, daß in das Wasser vornehmlich die verzuckernde bzw. die verzuckernden Diastasen übergehen, innerhalb der Dialysiermembran aber hauptsächlich die verflüssigenden Enzyme zurückbleiben. Vom Ausgang weiterer Versuche in dieser Richtung, wenn sie überhaupt nicht völlig unterlassen wurden, steht aber der Bericht noch aus[4]).

Eine Reihe von Versuchen gewährte mir seinerzeit[5]) einen tieferen Einblick in die Struktur der Stärkemolekel. Eines der Ergebnisse dieser Untersuchungen war die Erkenntnis, daß zwischen den die Stärkemolekel bildenden Glucoseresten fünf Arten von Ätherbindungen vorhanden sind. Diese Bindungen teile ich in zwei Gruppen ein:

a) *Carbinolbindungen*, an deren Bildung durch Wasseraustritt Hydroxyle von nur Alkoholgruppen ($\mathrm{H\,.\,\overset{|}{\underset{|}{C}}{-}OH}$ oder $\mathrm{H{-}\underset{|}{C}H\,.\,OH}$) teilnehmen; nach ihrer hydrolytischen Spaltung erscheint keine Atomgruppe, welche *Fehling*sche Lösung reduzieren würde.

b) *Carbonylbindungen*, an deren Entstehung durch Wasseraustritt wenigstens ein Carbonyl

$$\left(\begin{matrix}\mathrm{H}\\ \mathrm{C{-}OH}\\ \mathrm{O}\end{matrix}\ \text{bzw.}\ \begin{matrix}\mathrm{H}\\ \mathrm{O{=}O}\end{matrix}\ \text{oder}\ \mathrm{\overset{|}{\underset{|}{C}}}\begin{matrix}\mathrm{OH}\\ \mathrm{OH}\end{matrix}\ \text{bzw.}\ \mathrm{\overset{|}{\underset{|}{C}}{=}O}\right)$$

---

[1]) Versuche zur Herstellung von Reindiastase. Hofmanns Beitr. **8**, 398.

[2]) l. c.

[3]) Über das Verhalten des diastatischen Enzyms in der Keimpflanze. Pringsheims Jahrb. **26**, 379.

[4]) Siehe die Kritik *F. Münters* in „Über Reindiastase", Landw. Jahrb. **39**, Ergänzungsheft 3, S. 311.

[5]) Über die Konstitution der Stärke. II, Liebigs Ann. **324**, 212.

teilnimmt; nach ihrer hydrolytischen Spaltung wird selbstverständlich Carbonyl frei, das *Fehling*sche Lösung reduziert.

Die Stärkemolekel stelle ich mir als aus Glucoseresten auf nachfolgende Weise durch Vermittlung der fünf erkannten Bindungsarten aufgebaut vor:

Drei Glucosereste sind miteinander durch je eine Carbonylbindung zu einem ringförmigen Komplex zusammengesetzt; diesen nenne ich „Dextrinring", und die ihn zusammenhaltenden Bindungen *β-Carbonylbindungen.*

Mit einem jeden der drei Glucosereste des Dextrinringes ist je ein Maltoserest durch Vermittlung von je einer Carbonylbindung verbunden; diese Bindungen nenne ich *α-Carbonylbindungen.*

Die Glucosereste eines jeden Maltoserestes sind miteinander, wie bekannt, ebenfalls durch eine Carbonylbindung verknüpft; diese benenne ich *γ-Carbonylbindungen.*

Der auf die oben angegebene Art zusammengesetzte Komplex von $3 + 3 \times 2 = 9$ Glucoseresten ist mein Amylogen.

Durch Zusammentritt von mehreren (vier) solchen Amylogenresten entsteht die Molekel der Stärke; weil aber das Amylogen keine Carbonylhydroxyle mehr frei hat, so können beim Entstehen der Stärkemolekel aus Amylogen an der Bildung von anhydridischen Bindungen bloß Carbinolhydroxyle teilnehmen, wobei einerseits alle Dextrinringe untereinander verbunden, andererseits sämtliche Maltosereste auf irgend eine andere Art durch Carbonylbindungen miteinander verknüpft sind.

Die zwischen den Dextrinringen bestehenden Bindungen nenne ich *d-Carbinolbindungen,* die zwischen oder vielleicht in den Maltoseresten wirkenden *m-Carbinolbindungen.*

Die durch Hydrolyse, wie bekannt, stattfindende Spaltung einer oder mehrerer, welcher immer der oben genannten fünf Arten von Bindungen in der Stärkemolekel hat eine Umwandlung der Stärke in eine andere Substanz zur Folge. Wenn alle Bindungen hydrolysiert werden, dann entsteht ausschließlich Glucose, wenn aber bloß einzelne von ihnen oder nur einige Arten derselben gespalten werden, dann entstehen die vielen verschiedenen, eine solche Mannigfaltigkeit bildenden Zwischenprodukte, daß sie fast unentwirrbar erscheint.

Wenn nun fünf Arten von Bindungen vorhanden sind, so muß man konsequenterweise von fünf verschiedenen Arten hydrolytischer Spaltungsprozesse der Stärke reden, und dann ist die Möglichkeit nicht ausgeschlossen, daß es fünf enzymatische Katalysatoren dieser Prozesse, also fünf verschiedene diastatische Enzyme gibt.

Freilich könnte auch ein einziges Enzym vorhanden sein, das entweder alle oder wenigstens mehrere der obigen Hydrolysen katalysieren würde, ebenso wie es umgekehrt mehrere substantiell sonst verschiedene Enzyme geben könnte, welche sämtlich einen und denselben der obigen Prozesse, wenn auch mit verschiedener Geschwindigkeit, zu katalysieren imstande wären.

Prozesse, welche die m- oder d-Carbinolbindungen hydrolytisch zum Zerfall bringen würden, müßten Zersetzungsprodukte der Stärke liefern, die in Wasser löslich wären und *Fehling*sche Lösung nicht reduzieren würden; hier könnte man also nicht von „Verzuckerung“, sondern bloß von „Verflüssigung“ der Stärke bzw. des Stärkekleisters sprechen, und Enzyme, die hierbei katalytisch wirksam wären, dürfte man nur als „verflüssigende“ betrachten; sie könnten *Carbinoldiastasen* genannt werden. Prozesse aber, die durch Hydrolyse Carbonylbindungen sprengen würden, müßten *Fehling*sche Lösung reduzierende Zersetzungsprodukte liefern, und nachdem wir solche reduzierende Lösungen von Kohlenhydraten, wenn auch nicht immer mit Recht, als zuckerhaltig ansehen, so könnten wir diese Prozesse „Verzuckerungen“ nennen, und die sie katalysierenden Enzyme als „verzuckernde“ betrachten; sie sollen *Carbonyldiastasen* heißen.

Ich machte mich nun an die Arbeit zwecks Klärung der von diesem Gesichtspunkt aus aufgeworfenen Frage, wieviel Enzyme und welcher Art an der diastatischen Zersetzung der Stärke teilnehmen bzw. teilnehmen können, und da diese Frage am einfachsten und sichersten dadurch gelöst werden könnte, daß man die einzelnen Enzyme voneinander abgesondert erhält, so ging ich auf die Suche nach solchen Substanzen. Vor allem wandte ich mich den „verzuckernden“ Enzymen, also den Carbonyldiastasen zu.

Zwei derselben hatte ich wohl schon während der Untersuchung über die Konstitution der Stärke[1]), und zwar in den von mir angewandten Malzauszügen unter der Hand; hatte ich ja doch mit ihrer Hilfe jene α- und β-Spaltungen der Stärkemolekel ausgeführt, die mich nähere Einsicht in die Konstitution dieser Substanz nehmen ließen. Wenn aber im frischen Malzauszug wirklich zwei Enzyme vorhanden waren, so waren sie darin miteinander vermischt, und war es außerdem vom Katalysator im erhitzt gewesenen Malzauszug, der bloß die β-Bindungen lösen half, nicht bewiesen, daß er nicht ein durch das Erhitzen der Malzdiastase erhaltenes Kunstprodukt im Sinne *Beijerincks* sei. Trotzdem ich also eine ausschließlich β-hydrolytische Spaltung der Stärke vorzunehmen verstand, konnte ich doch nicht

[1]) Liebigs Ann. **309**, 382; **324**, 212.

behaupten, daß ich eine natürliche β-Diastase in Händen hatte; reine α-Diastase kannte ich überhaupt nicht.

Von dem Wunsche beseelt, ein nicht reduzierendes, von mir vorausgesehenes Grenzdextrin I[1]) herstellen zu können, um dadurch meine Vorstellung über die Konstitution der Stärke fester zu stützen, fahndete ich vor allem nach einem rein α-diastatischem Enzym, das mir die Darstellung eines solchen Dextrins ermöglichen könnte. Es wurden Versuche mit den verschiedensten bekannten diastatischen Auszügen gemacht, aber ohne Erfolg; sämtliche durch ihre Vermittlung aus Stärke erhaltenen Dextrine reduzierten *Fehling*sche Lösung, es mußte also in den betreffenden Auszügen neben α-Diastase auch das Vorhandensein eines anderen diastatischen Enzyms angenommen werden. An einem Versuch mit Gerstenauszug machte ich mich erst zu allerletzt, da ich, voreingenommen, jedoch mit Unrecht, wie es sich bald herausstellte, in ihm eine noch geringere Menge α-Diastase als im Malzauszug, und auch dies noch mit anderen diastatischen Enzymen vermengt, voraussetzte. Es hatten nämlich schon andere Autoren[2]) ermittelt, daß die Dextrine, die durch Gerstenauszug entstehen, sich mit Jod noch blau, violett oder mindestens rot färben; ich sah sie deshalb als vom gesuchten, nicht reduzierenden Grenzdextrin (das, meiner damaligen Ansicht nach über die Ursache des Jodfärbungsvermögens, ein Achroodextrin sein mußte) als in der Reihe der aufeinander folgenden hydrolytischen Zersetzungsprodukte vom Grenzdextrin noch weit entfernt an. Ich irrte mich aber dabei vollkommen; der erste, analytisch quantitativ genau verfolgte Verzuckerungsversuch mit Gerstenauszug belehrte mich, daß in ihm, wenn nicht ausschließlich, so doch höchstens mit Spuren anderer diastatischer Enzyme verunreinigte α-Diastase vorhanden war[3]).

Die im Gerstenauszug vorhandene α-Diastase hydrolysiert in der Tat bloß α-Carbonylbindungen der Stärkemolekel. Alle Maltosereste werden aus ihr abgespalten, und es bleibt als Rest nur eine einzige Substanz zurück, nämlich mein „nicht reduzierendes Grenzdextrin I", welches, weil aus lauter geschlossenen Dextrinringen zusammengesetzt, die kein freies Carbonyl haben, Fehlingsche Lösung nicht reduziert. Dieses Dextrin färbt sich mit Jod ebenso rein blau wie Stärke.

Nachdem ich so das α-diastatische Enzym in der „Gerstendiastase" *Lintners* bzw. der „Translokationsdiastase" *Browns* entdeckte, wurden mir die nicht übereinstimmenden Ergebnisse vieler Arbeiten anderer Autoren sowie die Resultate auch meiner Arbeiten, die nicht zu Ende

[1]) Liebigs Ann. **324**, 266.
[2]) Rec. des trav. chim. de Pays-Bas **9**, 1.
[3]) Siehe die Abhandlung in Liebigs Ann. **441**, 285.

geführt und nicht veröffentlicht wurden, weil sie sich ebenfalls nicht gut miteinander reimten, mit einem Schlage verständlich; sie wurden erst jetzt ins rechte Licht gerückt. Mir ward es klar, daß sich die Sache mit der Malzdiastase so verhält:

Gerste enthält bloß a-Diastase (bloß mit Spuren von β-Diastase vermengt), die β-Diastase entsteht im Gerstenkorn erst beim Mälzen. Das, was bisher Malzdiastase oder auch Sekretionsdiastase genannt wurde, oder, besser gesagt, das verzuckernde Agens des Malzes, ist somit nicht ein einziges verzuckerndes Enzym, sondern ein Gemisch ihrer zwei, der aus der rohen Gerste stammenden a-Diastase und der im Korne erst während des Mälzens entstehenden β-Diastase.

Daß α-Diastase in der Natur besteht, und daß sie ein auf Stärke spezifisch wirkendes Enzym ist, ist also eine Tatsache, die keines weiteren Beweises mehr bedarf, bewiesen muß aber werden, daß das auf Stärke ebenfalls spezifisch wirkende β-diastatische Agens des auf 78^0 erhitzt gewesenen Malzauszuges[1]) kein Kunstprodukt, sondern eine natürliche β-Diastase ist, welche sich im Malz mit α-Diastase vermischt befindet.

Den Beweis gedachte ich dadurch zu erbringen, daß ich einerseits das Gemisch von natürlicher α- und ebensolcher β-Diastase, wie es meiner Ansicht nach im Malzauszug vorlag, und andererseits ein künstlich entsprechend zusammengesetztes von α-diastatischem Agens des Rohgerstenauszuges mit dem β-diastatischen Agens eines erhitzt gewesenen Malzauszuges miteinander verglich, und zwar in bezug auf ihr Verhalten beim Erhitzen auf höhere Temperaturen und in bezug auf den durch sie hervorgerufenen Verlauf des Stärkeverzuckerungsprozesses. Wenn sich beide Mischungen identisch verhalten würden, dann wäre bewiesen, daß sie identische diastatische Substanzen enthielten, wenn das Gegenteil einträte, dann müßte das β-diastatische Vermögen des erhitzten Malzauszuges einem Kunstprodukt zugeschrieben werden.

Die Mischungen verhielten sich in der Tat gleich; es ist somit für mich unumstößliche Tatsache, daß der Malzauszug die beiden Enzyme, von welchen die Rede ist, wirklich enthält, daß ich somit die natürlichen Enzyme α- und β-Diastase in den oben genannten Auszügen voneinander getrennt in Händen habe.

Experimente.

I. Einfluß der Temperatur auf die Verzuckerungskraft von a-diastatischen Rohgersten- und β-diastisch gemachten Malzauszügen.

Das β-diastatische Vermögen des Malzauszuges trenne ich von dem α-diastatischen durch Erhitzen; es waren für mich deshalb die

[1]) Liebigs Ann. **324**, 213 ff.

Einzelheiten des Verhaltens dieser beiden Komponenten der gesamtdiastatischen Kraft verschiedenen Temperaturen gegenüber wichtig. Nun sind aber die Angaben der bisherigen Autoren in dieser Hinsicht teils nicht immer übereinstimmend, teils meinem Zwecke nicht vollkommen genügend; ich sah mich infolgedessen gezwungen, die Einwirkung der Temperatur einer erneuten systematischen Untersuchung zu unterwerfen. Diese wurde derart ausgeführt, daß ich die betreffenden Auszüge in Portionen von je 50 ccm in mit Kautschukpfropfen verschlossenen, mit Bleiringen beschwerten Erlenmeyerkolben von 150 ccm Inhalt in einem auf die betreffende Temperatur eingestellten *Ostwald*schen Thermostaten erwärmte. Eines der Kölbchen erhielt anstatt Auszug destilliertes Wasser (50 ccm) und in ihm wurde mittels Thermometers der Verlauf der Steigerung usw. der Temperatur beobachtet. Nach dem Erwärmen wurden die Kölbchen alsogleich in Schnee gestellt, der Inhalt, wenn abgekühlt, filtriert und im Filtrat die diastatische Kraft bestimmt. Diese Bestimmung geschah auf die erste von *Lintner* angegebene Art[1]). Mit Rücksicht jedoch auf das schwächere diastatische Vermögen der Rohgerstenauszüge im Vergleich mit Auszügen aus Malz wandte ich eine andere Skala an, was übrigens, da es nur um Vergleichsresultate zu tun war, gleichgültig war.

Die Auszüge wurden gewöhnlich im Verhältnis von 1 Teil Gerste bzw. 1 Teil Malz zu 5 Teilen Wasser hergestellt; bei anderem Verhältnis ist dasselbe angegeben. Diese Auszüge verdünne ich bei Gerste mit Wasser im Verhältnis von 1 : 5 und betrachte die diastatische Kraft D dann als gleich 100 Einheiten, wenn 0,5 ccm des einmal verdünnten Auszuges 10 ccm 2proz. *Lintner*scher Stärkelösung in 1 Stunde bei 18° so weit „verzuckern", daß sie 5 ccm *Fehling*scher Lösung eben vollkommen reduzieren. Die diastatische Kraft gebe ich dann immer für unverdünnten Auszug an. Bei Malz verdünne ich den Auszug vor der Bestimmung im Verhältnis von 1 : 25 und gebe auch hier die diastatische Kraft des unverdünnten Auszuges an. Bei anderer Verdünnung gebe ich dies an.

Die verschiedenen Kräfte bezeichne ich mit:

D_α = α-diastatische Kraft,
D_β = β-diastatische Kraft,
$D_{\alpha+\beta}$ = $(\alpha + \beta)$-diastatische Gesamtkraft.

Die auf die einzelnen Probierröhrchen des *Reischauer*schen Sterns zu verteilenden Ausgangsmengen wurden so berechnet (*Seyffert*), daß sie gleichen Intervallen der diastatischen Kraft entsprachen, und zwar in nachfolgender Skala:

[1]) Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen **20**, 281.

Menge des Auszuges ccm	Verzuckerungskraft $D =$	Menge des Auszuges ccm	Verzuckerungskraft $D =$
0,500	100	1,000	50
0,526	95	1,111	45
0,555	90	1,250	40
0,588	85	1,429	35
0,625	80	1,666	30
0,666	75	2,000	25
0,714	70	2,500	20
0,769	65	3,333	15
0,833	60	5,000	10
0,909	55	10,000	5

Die ersten zwei Dezimalen wurden an der Pipettenteilung abgelesen, die dritte bloß abgeschätzt. Es wurde meistens getrachtet, durch entsprechende Verdünnung des Auszuges eine diastatische Kraft in ihm zwischen 80 und 40 Einheiten zu bekommen, da die Bestimmung in diesen Grenzen die geringsten Fehler ergibt. Immerhin begeht man bei dieser, unter allen bekannten besten Methode einen Fehler von mindestens 2,5 Einheiten, der sich bei der Umrechnung auf den unverdünnten Auszug entsprechend in Einheiten vergrößert, prozentual aber selbstverständlich auch dann gleich bleibt.

Die Zahlenergebnisse der Erwärmungsversuche sind in nachfolgenden Tabellen zusammengestellt:

a) α-diastatischer Rohgerstenauszug:

Versuch 1. Temperatur 40°.

Probe Nr.		$D_\alpha =$	Bemerkungen
0	Nicht erwärmt	300	
1	20 Minuten erwärmt	—	Angesichts des bei Nr. 6 (von wo ab die Bestimmung begonnen wurde) erhaltenen Resultates, war die Ermittlung bei 1 bis 5 überflüssig
2	40 „ „	—	
3	60 „ „	—	
4	80 „ „	—	
5	100 „ „	—	
6	120 „ „	300	

Der Auszug war in sämtlichen Proben auch nach dem Erwärmen klar.

Aus obigem ist zu ersehen, daß eine Temperatur von 40° auch durch 2 Stunden auf die α-diastatische Kraft überhaupt nicht oder jedenfalls nicht merklich abschwächend einwirkt.

Versuch 2. Temperatur 50°.

Probe Nr.		$D_\alpha =$	Bemerkungen
0	Nicht erwärmt	300	
1	20 Minuten erwärmt	300	
2	40 „ „	290—295	
3	60 „ „	287,5	
4	80 „ „	287,5	
5	100 „ „	—	Verunglückt
6	120 „ „	262,5	

Der Auszug war bereits in Nr. 1 getrübt; die Trübung war in den höheren Nummern immer dichter.

Bei 50⁰ beginnt somit die α-diastatische Kraft des Auszuges abzunehmen, wenn er länger als 20 Minuten erwärmt wird.

Versuch 3. Temperatur 60⁰.

Probe Nr.		$D_\alpha =$	Bemerkungen
0	Nicht erwärmt	300	
1	20 Minuten erwärmt	0	Stark getrübt, die Trübung bildet keine sichtbaren Flocken
2	40 „ „	0	Die Trübung teilweise feinst ausgeflockt am Boden
3	60 „ „	0	Trübung vollkommen und grob ausgeflockt

Eine Temperatur von 60⁰, während 20 Minuten wirkend, vernichtet somit die α-diastatische Kraft des Rohgerstenauszuges vollständig.

Es wurde nun versucht, die Temperatur, bei welcher die Vernichtung der α-diastatischen Kraft innerhalb von 20 Minuten stattfindet, genauer zu erfassen.

Versuch 4. Temperatur ansteigend von 50 bis 60⁰.

Probe Nr.		$D_\alpha =$	In Proz. der Anfangskraft	Bemerkungen
0	Nicht erwärmt	275	100	Klar
1	20 Minuten erwärmt auf 50⁰ C	237,5	86,36	Leicht getrübt
2	20 „ „ „ 52	237,5	86,36	„ „
3	20 „ „ „ 54	237,5	86,36	„ „
4	20 „ „ „ 56	162,5	59,09	Stark „
5	20 „ „ „ 58	62,5	22,70	Ausgeflockt
6	20 „ „ „ 60	0	0	„

Versuch 5. Temperatur 60⁰.

(Verschieden lange Dauer der Einwirkung.)

Probe Nr.		$D_\alpha =$	In Proz. der Anfangskraft	Bemerkungen
0	Nicht erwärmt .	250	100	Klar
1	5 Min. erwärmt	50	20	Getrübt
2	10 „ „	25	10	Nr. 2 bedeutend stärker getrübt als Nr. 1. Sämtliche Proben setzen nach 4 Tagen am Boden einen feinflockigen Niederschlag ab mit einer klaren Flüssigkeit darüber
3	15 „ „	12,5	5	
4	20 „ „	0	0	
5	25 „ „	0	0	

Die Versuche 3, 4 und 5 ergaben unzweifelhaft, daß die α-diastatische Kraft des Rohgerstenauszuges durch 20 Minuten langes Erhitzen erst bei 60⁰, aber dann vollkommen vernichtet wird.

b) Rein β-diastatisch gemachter Malzauszug.

Es wurde auf analoge Weise, wie aus Rohgerste, ein Auszug aus Lufttrockenmalz hergestellt, das in einer Brennerei[1]) aus der nämlichen Gerste bereitet worden war.

Nachdem mich die obigen Versuche belehrt hatten, daß das diastatische Vermögen der Gerste im Auszug durch ein 20 Minuten dauerndes Erhitzen auf 60° vollkommen vernichtet wird, unterwarf ich den erhaltenen Malzauszug einer solchen Erhitzung, um in ihm das im Gerstenkorn während der Mälzung entstandene β-diastatische Vermögen frei vom α-diastatischen zu erhalten.

800 ccm des vollkommen klaren Auszuges wurden in zwei zugedeckten Metallbechern in einem auf 60° erwärmten Wasserthermostaten (der 10 Liter faßte) erhitzt. 30 Minuten verflossen, bis sich der Inhalt der Becher auf 60° erwärmte, worauf dann noch durch 20 Minuten gewartet wurde. Die Becher wurden jetzt rasch in Eiswasser abgekühlt und dann ihr Inhalt klar filtriert.

Die diastatische Kraft des frischen Malzauszuges betrug 687,5 Einheiten. Nach dem erwähnten Erhitzen betrug nun die nur mehr übrig gebliebene diastatische Kraft 300 Einheiten. Der ursprüngliche Auszug hatte somit von seiner Kraft 387,5 Einheiten eingebüßt.

Dieser jetzt ausschließlich β-diastatische Malzauszug wurde nun zu je 50 ccm auf Kölbchen verteilt und, wie bei den früheren Versuchen beschrieben, im Thermostaten erwärmt.

Versuch 6. Temperatur 60°.

Probe Nr.		$D_\beta =$	In Proz. der Anfangskraft
0	Nicht erwärmt	300	100
1	20 Minuten erwärmt	237,5	79,1
2	40 „ „	212,5	70,8
3	60 „ „	187,5	62,5
4	80 „ „	175,0	58,3
5	100 „ „	162,5	54,1
6	120 „ „	150,0	50,0

Aus obigem ersieht man, daß das diastatische Agens des vorher erhitzt gewesenen Malzauszuges beträchtlich widerstandsfähiger ist gegen Erwärmung als das diastatische Agens der Rohgerste.

Versuch 7. Temperatur ansteigend von 64 bis 80°.

Probe Nr.		$D_\beta =$	In Proz. der Anfangskraft
0	Nicht mehr erwärmt	300	100
1	20 Minuten erwärmt auf 64° C . . .	137,5	45,8
2	20 „ „ „ 68 . . .	125,0	41,6
3	20 „ „ „ 72 . . .	87,5	29,1
4	20 „ „ „ 76 . . .	unter 12,5	unter 4,2
5	20 „ „ „ 80 . . .	0	0

[1]) Zurawiczki bei Przeworsk. Es sei mir hier erlaubt, Herrn Brennereiverwalter *Albin Bilicz* für die mir bereitwilligst und sachkundig gebotene Hilfe bestens zu danken.

Zu weiteren Versuchen wurde neuer Malzauszug genommen, weil der frühere erschöpft war. Die diastatische Kraft dieses Auszuges war 717,5 Einheiten; nach dem Erhitzen auf 60° verblieben 325 Einheiten (bestimmt bei 20°).

Der Auszug wurde jetzt zu je 25 ccm auf Kölbchen verteilt, wie früher beschrieben durch 5 Minuten verschieden hoch erhitzt, um die niedrigste Temperatur zu finden, bei welcher der Auszug seine β-diastatische Kraft zu verlieren beginnt, sowie die höchste, bei welcher seine Kraft in dieser kurzen Zeit völlig erlischt.

Versuch 8. Temperatur ansteigend von 50 bis 80°.
(Dauer der Erwärmung 5 Minuten.)

Probe Nr.		D_β = (bestimmt bei 20° C)	Probe Nr.		D_β = (bestimmt bei 20° C)
0	Nicht mehr erwärmt	325	9	Erwärmt auf 66° C	137,5
1	Erwärmt auf 50° C	325	10	" " 68	125
2	" " 52	325	11	" " 70	125
3	" " 54	300	12	" " 72	112,5
4	" " 56	300	13	" " 74	100
5	" " 58	350 (!)	14	" " 76	62,5
6	" " 60	325 (!)			
7	" " 62	287,5	15	" " 78	unter 12,5
8	" " 64	162,5	16	" " 80	0

Bemerkung: Von 62° C an beginnt sich der Auszug zu trüben.

Es wurde noch ein besonderer Versuch unternommen, um zu bestimmen, ob Probe Nr. 16, die auf gewöhnliche Art untersucht, keine diastatische Kraft mehr aufwies, nicht doch noch eine, wenn auch geringe, solche Kraft hatte. Es wurde mit je 0,5 ccm des Auszuges eine Reihe von Proberöhren beschickt, die bereits eine Reihe von abfallend immer geringeren Mengen (von 2 ccm angefangen) einer verdünnten ($^1/_{100}$proz.) Lösung meines nicht reduzierenden Grenzdextrins I (die sich mit Jod noch intensiv blau färbte) enthielten. Diese Proberöhren wurden durch 10 Stunden bei Zimmertemperatur gehalten, worauf dann mit Jod untersucht wurde. Keines der Röhrchen wies mehr eine blaue Färbung auf; die ersten waren rot, die letzten sogar farblos. Es zeigte sich somit, daß ein Erhitzen während 5 Minuten auch auf 80° noch nicht genügt, um das β-diastatische Vermögen des Malzauszuges vollkommen zu vernichten.

II. Vergleich des Verhaltens von einerseits nicht denaturierten und andererseits künstlich gemischten ($\alpha + \beta$)-diastatischen Auszügen höheren Temperaturen und Stärkelösungen gegenüber.

A. Herstellung der zu vergleichenden ($\alpha + \beta$)-diastatischen Mischungen.

Meiner Ansicht nach liegt eine natürliche Mischung der beiden diastatischen Kräfte im Malzauszug vor, eine künstliche gedachte ich aus einem α-diastatischen Rohgerstenauszug und aus einem durch Erhitzen auf 60 bis 61° ausschließlich β-diastatisch gemachten Malzauszug herzustellen, wobei ich von der Voraussetzung ausging, daß

im betreffenden Auszug das gesamte α-diastatische Vermögen der angewandten Rohgerste vorhanden sein wird, im Malzauszug aber neben der nämlichen Größe des genannten Vermögens, wie es in den rohen Körnern bereits vor der Mälzung vorhanden war, auch das gesamte, während des Mälzens entstandene β-diastatische Vermögen. Bei dieser Voraussetzung schien mir die Herstellung einer künstlichen $(\alpha + \beta)$-diastatischen Mischung eine sehr einfache Aufgabe zu sein.

Es wurden zwei Proben zu je 2000 Gerstenkörnern abgezählt; sie wogen übereinstimmend je 69,4 g. Eine dieser Proben wurde eingeweicht und gemälzt, die andere wurde roh belassen. Die Mälzung dauerte 10 Tage bei 15°. Hierauf wurde das Wachstum durch Schwenkung unterbrochen und das Malz an der Luft ohne Temperaturerhöhung vollkommen getrocknet, was 2 Wochen dauerte. Das Malz wog lufttrocken 60 g.

Sowohl die Rohgerste (69,4 g) als auch das Luftmalz (60 g) wurden jetzt auf einer Handmühle gemahlen und aus den Mehlen Auszüge hergestellt.

Rohgerstenauszug. Die ganze Mehlportion wurde mit 350 ccm destillierten Wassers versetzt, durch 2 Stunden mittels eines Glasstabes mit der Hand gerührt und dann klar filtriert. Die diastatische Kraft dieses Auszuges betrug 112,5 Einheiten.

Malzauszug. Die ganze Mehlportion wurde wie beim vorigen Versuch behandelt. Die diastatische Kraft dieses Auszuges betrug 1437,5 Einheiten. Durch 20 Minuten auf 60 bis 61° erhitzt, abgekühlt und filtriert, wies der Auszug eine Kraft von 500 Einheiten auf.

Dieser durch Erhitzen rein β-diastatisch gemachte Malzauszug wies im Vergleich mit dem frischen eine bedeutend geringere diastatische Kraft auf. Dies konnte nur davon herrühren, daß vor allem sämtliche α-Diastase vernichtet wurde. Es wurden aber bei der Erhitzung auch etwa 20 Proz. der β-diastatischen Kraft vernichtet (vgl. die Ergebnisse des Versuchs 6 auf S. 99). Wenn somit der Auszug nach der Erhitzung noch 500 diastatische (wohl β-) Einheiten aufwies, so mußte er im frischen Zustande solcher β-diastatischen Einheiten etwa 625 enthalten haben. Weil aber der frische Auszug 1437,5 diastatische Einheiten überhaupt enthielt, so war der Schluß zu ziehen, daß dann etwa $1437{,}5 - 625 = 812{,}5$ Einheiten im Malzauszug an α-diastatischer Kraft enthalten waren.

Vergleicht man nun die letztere Zahl mit derjenigen, welche die α-diastatische Kraft des Rohgerstenauszuges angibt, nämlich 112,5, so ergibt sich ein ungeheurer Unterschied, aus dem geschlossen werden muß, daß entweder nicht sämtliche α-Diastase der Rohgerste in den aus der letzteren hergestellten Auszug bei den gegebenen Bedingungen überging im Gegensatz zu solcher Diastase des Malzes, oder aber, daß das im Malze festgestellte große Plus an α-Diastase im Korne erst beim Mälzen entstand. Ich sah infolge dieses Ergebnisses ein, daß die Herstellung eines künstlich gemischten $(\alpha + \beta)$-diastatischen Aus-

zuges nicht so einfach sein wird, wie ich es mir anfangs vorstellte, und daß ich mich vorerst davon überzeugen mußte, welcher der beiden genannten Möglichkeiten das so bedeutende Plus an α-Diastase im Malze zuzuschreiben ist, denn hiervon würde selbstverständlich mein weiteres Vorgehen beeinflußt sein müssen. Wenn nämlich die α-Diastase des Malzes wirklich, wie ich schon eingangs voraussetzte, ausschließlich aus der Rohgerste stammt und nicht bei der Mälzung zunimmt, so würde die Herstellung einer der natürlichen gleichen, künstlich $(\alpha + \beta)$-diastatischen Mischung der Auszüge noch immer eine einfache Aufgabe sein, sofern ich nur die Extraktion sämtlicher einerseits α-Diastase der Rohgerste, andererseits α -und β-Diastase des fertigen Malzes auszuführen verstünde, wenn sie aber auch noch während des Mälzens entsteht, dann würde sich die gestellte Aufgabe bedeutend komplizieren. Es mußte daher vor allem noch darüber eine Untersuchung angestellt werden, welche größten Mengen an α-Diastase die Rohgerste überhaupt enthält und unter welchen Bedingungen sich diese Menge vollständig herauslösen läßt. Es sollten also Untersuchungen darüber angestellt werden:

wie lange die Extraktion dauern soll, um die ganze, im Korne vorhandene Enzymmenge in Lösung zu bringen?

wie fein die Gerste für diesen Zweck gemahlen werden soll?

ob es besser ist, mit wenig oder mit viel Wasser auszulaugen?

welchen Einfluß eine Temperaturerhöhung auf die vollständige Extraktion hat?

Antwort auf diese Fragen sollten die Zahlen geben, die man bei der Bestimmung der diastatischen Kräfte der unter den verschiedenen Bedingungen hergestellten Auszüge erhält.

a) Einfluß der Extraktionsdauer. Die Gerste wurde auf einer Maercker-mühle zu feinstem Mehl vermahlen. 25 g des Mehles wurden mit 150 ccm destillierten Wassers unter fortwährendem Quirlen mittels eines Motors entsprechend lange bei Zimmertemperatur (19°) ausgelaugt, dann klar filtriert und im Filtrat die diastatische Kraft bestimmt.

Nachfolgende Tabelle bringt die Ergebnisse der Versuche:

Extraktionsdauer	Diastatische Kraft	Extraktionsdauer	Diastatische Kraft
1 Stunde	125	7 Stunden	262,5
2 Stunden	150	8 „	275
4 „	187,5	9 „	300
6 „	262,5	12 „	300

Eine neunstündige Extraktionsdauer hatte somit bei so fein gemahlener Gerste, wie es auf der Maerckermühle möglich ist, das Maximum an diastatischer Kraft bei Zimmertemperatur herausgelöst.

b) Einfluß der Mahlfeinheit. Eine Gerstenprobe wurde in drei gleiche Portionen geteilt; die erste wurde auf einer Handmühle grob geschrotet,

so daß jedes Korn in etwa 5 bis 15 Teile zerfiel, die zweite auf einer Kaffeemühle möglichst fein zu Mehl vermahlen, die dritte aber noch auf einer Maerckermühle in feinstes Mehl verwandelt. Die Extraktion dauerte 9 Stunden bei Zimmertemperatur (19°). Die Auszüge wiesen nun nachfolgende Kräfte auf:

Feinheit der Mahlung	Diastatische Kraft
Grob auf einer Handmühle	200
Fein auf einer Kaffemühle	300
Feinst auf einer Maerckermühle	300

Es genügte somit die Mahlung auf einer Kaffeemühle für die Extraktion des überhaupt extrahierbaren diastatischen Agens.

c) Einfluß der extrahierenden Wassermenge. Es wurden je 25 g auf einer Maerckermühle feinst gemahlenen Gerstenmehls angewendet. Eine Portion wurde mit 150 ccm Wasser 9 Stunden unter fortwährendem Quirlen bei 19° ausgelaugt und im klaren Filtrat, nach Verdünnen im Verhältnis von 1 : 5, die diastatische Kraft bestimmt. Die zweite Portion wurde auf die nämliche Art direkt mit 750 ccm Wasser ausgelaugt und im Filtrat dann ohne Verdünnung die diastatische Kraft bestimmt:

Ausgelaugt mit	Diastatische Kraft
150 ccm Wasser und dann im Verhältnis von 1:5 verdünnt .	60
750 ccm Wasser und nicht mehr verdünnt	60

Bei maximaler Extraktionsdauer ist die Anwendung einer sechsfachen Menge Wassers zum Auslaugen vollkommen genügend; größere Wassermengen bringen nicht mehr Diastase heraus.

d) Einfluß der Temperatur. Bei Anwendung von höheren Temperaturen während der Extraktion mußte man mit der Möglichkeit einer starken Entwicklung von Mikroorganismen und mit den davon herrührenden schädlichen Folgen rechnen; es mußte deshalb ein antiseptisches Mittel zu Hilfe genommen werden. Ich versuchte verschiedene Gaben von Formaldehyd. Die Ergebnisse bringt folgende Tabelle:

Temperatur	Diastatische Kraft des ohne Zusatz von Formaldehyd erhaltenen Auszugs		
19—20° C	325	325	325
° C	Diastatische Kraft des mit Zusatz von 2proz. Formaldehydlösung erhaltenen Auszugs		
	6 ccm = 0,080 proz. Formaldehyd	3 ccm = 0,0399 proz. Formaldehyd	2 ccm = 0,0266 proz. Formaldehyd
19—20	162,5	287,5	325
25	137,5	250,0	325
30	137,5	225,0	325
35	137,5	212,5	325
40—41	112,5	—	187,5
Entwicklung von Organismen	Auch nach 7 Tagen keine Entwicklung zu bemerken	Nach 5 Tagen erschienen vereinzelte Kolonien von Schimmelpilzen, keine Bakterien	Nach 3 Tagen erschienen Sproßpilze und oidium lactis, keine Bakterien

Aus obigem ist ersichtlich, daß Formaldehyd in größeren Gaben für die Extraktion schädlich ist und daß er bei der unschädlichen Dosis auch nicht mehr absolut antiseptisch wirkt. Die Zahlen der dritten Reihe lassen jedoch ersehen, daß eine Anwendung von antiseptischen Mitteln hier überhaupt nicht in Frage zu kommen braucht, *da eine Temperaturerhöhung, bei welcher antiseptische Mittel notwendig wären, keine größeren Diastasemengen im Auszuge ergibt, wie gewöhnliche Zimmertemperatur; bei dieser wird in der maximalen Auslaugezeit von 9 Stunden sämtliche überhaupt auslaugbare Diastase auch wirklich herausgelöst.*

Die Vermehrung der Diastasemenge im Auszug beim lange dauernden Auslaugen des Gerstenmehls ist leicht durch den physikalischen Vorgang der Lösung der diastatischen Substanz zu erklären, es ist aber auch nicht von der Hand zu weisen die Annahme, daß sie einer „Autoexzitation" im Sinne *Maquennes*[1]) oder auch einer Proteolyse, wie sie sich *Ford* und *Guthrie*[2]) vorstellen, zu verdanken ist. Ich dachte hierbei an β-Diastaseentstehung. Ich mußte nun Gewißheit darüber erlangen, da hiervon dann mein weiteres Vorgehen bei der Herstellung der künstlichen Mischung von α- und β-Diastase höchst beeinflußt sein mußte.

e) Rührt das vergrößerte diastatische Vermögen des durch länger dauernde Extraktion erhaltenen Rohgerstenauszuges von α- oder von β-Diastase her?

Antwort auf diese Frage ist leicht zu erhalten. Man braucht nur die α-Diastase durch 20 Minuten langes Erhitzen des Auszuges auf 60 bis 61° zu vernichten und dann festzustellen, ob der Auszug überhaupt noch diastatisch wirkt bzw. ob er auf Stärke so einwirkt, daß sie sich schließlich in eine mit Jod nicht mehr färbende Substanz umwandelt; β-Diastase würde nämlich die erwähnte Erhitzung zum größten Teile überstehen und dann auf die genannte Art auf Stärke einwirken.

Es wurde ein auf eine bekannte Art durch *einstündiges* Auslaugen hergestellter Rohgerstenauszug von $D_\alpha = 200$ durch 20 Minuten auf 61° erhitzt. Die diastatische Kraft des klaren und abgekühlten, mit Wasser im Verhältnis von 1 : 5 verdünnten Filtrats war Null oder jedenfalls unter 0,25 (darunter mittels der *Lintner*schen Methode nicht mehr bestimmbar). Es war somit sicher, daß die diastatische Kraft, die nach einstündigem Auslaugen im Auszug festgestellt wurde, der α-Diastase zuzuschreiben ist. Ob aber der Auszug nicht doch noch eine geringe Menge β-Diastase enthält, wurde auf nachfolgende Art zu ermitteln getrachtet.

Es wurde eine 0,1proz. klare Lösung von Amylodextrin bereitet und mit ihrer Hilfe folgende Mischungen zusammengestellt:

50 ccm Amylodextrinlösung + 5 ccm des Auszugs zu 100 ccm mit Wasser ergänzt, dann ebenso weiter mit je 10, 15, 20 und 25 ccm des Auszugs.

---

[1]) l. c.

[2]) Beiträge zur Biochemie der Gerste. Wochenschr. f. Brauwesen 1908, 164.

Mit diesen Mischungen wurden Büretten gefüllt und aus ihnen von Zeit zu Zeit, zur Prüfung des Verlaufs der Hydrolyse, je 2 ccm dieser Mischungen zu 1 ccm 0,005 n Jodlösung abgelassen. Die Ergebnisse bringt nachfolgende Tabelle:

Einwirkungsdauer Std.	Angewandte Auszugsmenge in ccm 5	10	15	20	25
1	blau	blau	blau	blau	blau
2	"	"	"	"	"
4½	"	"	schwach violetter Stich	schwach violetter Stich	deutlich violetter Stich
7½	"	"	deutlich violetter Stich	deutlich violetter Stich	violett
21½	"	violetter Stich	violett	rotviolett	karmoisinrot
31½	schwach violetter Stich	deutlich violetter Stich	"	karmoisinrot	braun
45	deutlich violetter Stich	deutlich violetter Stich	rotviolett	rein rot	schwach braun
54½	deutlich violetter Stich	blauviolett	rein rot	braun	schwach bräunl.
69	blauviolett	violett	rotbraun	schwach braun	jodfarben

Dieser Versuch zeigte, daß der angewandte Gerstenauszug noch ein β-diastatisches Vermögen aufwies.

Nachfolgende Berechnung gibt annähernd einen Begriff über die Größe der noch vorhandenen diastatischen Kraft:

50 ccm 0,1 proz. Amylodextrinlösung wurden im oben angeführten Versuch durch 25 ccm des im Verhältnis von 1 : 5 verdünnten Auszugs verzuckert. Wenn wir ausschließlich die Auszugsmenge in Rechnung zögen, im übrigen aber annehmen würden, daß alle sonstigen Bedingungen jenen gleich wären, die man bei der Bestimmung der diastatischen Kraft nach *Lintners* Methode einzuhalten hat, so wäre bei Berücksichtigung meiner Skala die diastatische Kraft gleich 10 zu setzen. Nun war jedoch die angewandte Amylodextrinlösung 20mal schwächer als bei *Lintner*, es ist deshalb die diastatische Kraft mit 0,5 zu bemessen. Bei *Lintner* wird das Ende der Verzuckerung aus der Entfärbung von 5 ccm *Fehling*scher Lösung beurteilt, was der Entstehung von etwa 0,036 82 g Maltose entspricht, im obigen Versuch wurde aber das Ende des Prozesses durch die Erreichung des achromatischen Punktes in der Jodfärbung angezeigt, also durch die Umwandlung sämtlichen Amylodextrins in mit Jod sich nicht mehr färbendes Grenzdextrin II. 10 ccm der 0,1 proz. ursprünglichen Amylodextrinlösung (= 0,01 g Amylodextrin) enthalten nach Erreichung des achromatischen Punktes 0,003 g scheinbarer Maltose (Reduktionsvermögen des hier entstandenen Grenzdextrins II = 30 Proz. R_{Maltose})[1]); die diastatische Kraft muß aus diesem Grunde im Verhältnis von 0,036 82 zu 0,003, also 12,27 mal kleiner bemessen werden, sie würde somit 0,0407 Einheiten betragen. Die gewöhnliche Skala gilt für einstündige Verzuckerungsdauer, obige Verzuckerung hat aber 69 Stunden gedauert; die diastatische Kraft, die hier gewirkt hat, ist also entsprechend geringer, und zwar bei Berücksichtigung der *Schütz-Borrissow*schen Regel 8,3 mal kleiner zu bemessen, woraus folgt, daß die diastatische Kraft im fünfmal verdünnten

[1]) Liebigs Ann. **324**, 222.

Auszug nur etwa 0,0049, im unverdünnten also 0,0245 *Lintner*sche Einheiten betragen haben kann. Dies macht nun etwa 0,012 Proz. der im nicht erwärmten Auszug vorhandenen diastatischen Kraft aus.

β-Diastase ist somit nach einstündiger Extraktion nur in äußerst geringen Mengen im Rohgerstenauszug vorhanden.

Es wurde jetzt aus dem gleichen Gerstenmehl ein neuer Auszug auf vollkommen dieselbe Art wie früher hergestellt, nur dauerte die Extraktion nicht *eine*, sondern *neun* Stunden. Der Auszug wies eine diastatische Kraft von 325 Einheiten auf. Nach einem 20 Minuten langen Erhitzen auf 60^0 fiel auch seine α-diastatische Kraft auf Null oder mindestens bis unter 0,25.

Es war also ersichtlich, daß die Zunahme von 125 Einheiten an diastatischer Kraft durch länger dauernde Auslaugung nicht der Bildung von β-Diastase zuzuschreiben war.

Eine auf dieselbe Art wie beim vorigen Versuch vorgenommene Bestimmung der vorhandenen β-diastatischen Kraft ergab die Zahl 0,0305, was etwa 0,0094 Proz. der ursprünglichen diastatischen Kraft (325) ausmacht.

f) Einfluß von proteolytischem Enzym auf das Ergebnis der Extraktion von Rohgerstenmehl. Die unter a) bis e) angeführten Vorversuche ergaben, daß bei Anwendung von auf einer Kaffeemühle fein gemahlener Rohgerste und bei neunstündiger Extraktion das Maximum der Ausbeute an α-diastatischer Kraft aus der von mir benutzten Gerstenprobe erhalten wird, und daß weder eine Temperaturerhöhung noch die Anwendung größerer Wassermengen diese Ausbeute vermehrt. Der Auszug zeigt immer die maximale Kraft von $D_\alpha = 325$ Einheiten.

Wenn man nun dieses Ergebnis mit der wenn auch angenäherten Minimalzahl der α-diastatischen Einheiten, die ich im angewandten Malzauszug zu vermuten einen triftigen Grund hatte (s. S. 101), nämlich etwa 677[1]), vergleicht, so sieht man, daß das Maximum an Ausbeute, welches man durch eine langdauernde Extraktion erhält, noch weit von einer befriedigenden entfernt ist. Wenn wir annehmen würden, daß durch maximale Extraktionsdauer dem Gerstenmehl sämtliche in ihm wirklich vorhandene α-diastatische Kraft entzogen würde, so bliebe uns bei dem Ergebnis obiger Versuche nur der Schluß übrig, daß das im Malze festgestellte Mehr an α-Kraft, nämlich $677 - 325 = 352$ Einheiten im Malze erst während der Keimung der Körner entstanden war. Wenn wir hier aber der bereits erwähnten *Ford* und *Guthrie*schen Versuche gedenken[2]), so gelangt diese Frage in ein neues

---

[1]) Die dort angegebene Zahl muß, um mit den jetzt angewandten Auszügen von geringerer Konzentration verglichen werden zu können, entsprechend, und zwar zu 677 verkleinert werden.

[2]) l. c.

Licht; es erscheint dann nicht unwahrscheinlich, daß sich die Sache also verhält: Die Rohgerste enthält schon von Haus aus jene Menge an α-diastatischer Kraft, die im Auszug aus Malz sich vorfindet, nur ist ihr diese Menge durch Wasser nicht im ganzen entziehbar, weil ein gewisser, und zwar ein ziemlich großer Anteil der vorhandenen Diastase von in Wasser unlöslichen oder vielleicht sehr schwer löslichen eiweißartigen Substanzen absorbiert oder adsorbiert ist und erst dann extrahierbar wird, wenn diese Substanzen auf irgend eine für das Enzym selbst unschädliche Weise gelöst werden; im Malze geschieht dies wohl durch Proteolyse, die während des Mälzens stattfindet.

So wurde ich genötigt, den Einfluß von proteolytischem Enzym auf die Größe der aus Rohgerste extrahierbaren α-diastatischen Kraft zu untersuchen.

α) Einwirkung einer einprozentigen Lösung von Papayotin durch 9 Stunden.

1,5 g Papayotin wurden in 150 ccm Wasser gelöst und dazu, ohne das Trübe abzufiltrieren, 25 g Rohgerstenmehl getan. Die unter fortwährendem Quirlen vor sich gehende Extraktion dauerte 9 Stunden bei Zimmertemperatur (19 bis 20°). Dann wurde filtriert und im klaren Filtrate auf bekannte Art die diastatische Kraft bestimmt; sie betrug 1062,5 Einheiten.

β) Einwirkung einer gleichen Papayotinlösung durch 27 Stunden.

Dieser Versuch wurde ebenso wie der vorige ausgeführt, nur dauerte die Extraktion 27 Stunden, weshalb Formaldehyd (0,0266 Proz.) zugesetzt werden mußte. Die diastatische Kraft des klaren Auszugs betrug ebenfalls 1062,5 Einheiten.

γ) Einfluß einer toten einprozentigen Lösung von Papayotin auf die Bestimmung der diastatischen Kraft des Auszugs.

Es wurde ein Rohgerstenauszug mittels reinen Wassers hergestellt; mit Wasser im Verhältnis von 1 : 5 verdünnt, wies er eine Kraft von 65 Einheiten auf. Eine zweite Portion des Auszugs wurde nun nicht mit Wasser, sondern mit einer toten (durch Aufkochen) 1proz. Papayotinlösung verdünnt und in dieser Lösung die diastatische Kraft bestimmt. Sie betrug jetzt 75 Einheiten.

Substanzen also, die aus dem Papayotinpräparat stammen, beeinflussen die Bestimmung der diastatischen Kraft, dieser Einfluß ist jedoch verhältnismäßig unbedeutend, so daß die Zunahme an Kraft in mit Papayotinlösung hergestellten Auszügen nicht diesen Substanzen, sondern wohl dem Papayotin selbst zuzuschreiben ist.

Auch hier mußte ich mich noch überzeugen, ob diese Zunahme an Kraft nicht dem β-diastatischen Agens zuzuschreiben ist. Der Auszug von anfänglicher Kraft von 1062,5 Einheiten wies nach 20minutigem Erhitzen auf 61 bis 62° keine mittels der *Lintner*schen Methode feststellbare diastatische Kraft mehr auf, was beweist, daß keine β-diastatische Kraft im nicht erhitzten Malzauszug vorhanden war, das diastatische Vermögen somit nur auf das Vorhandensein von α-Diastase zurückzuführen war.

Obige Versuche ergeben, daß die Gerste tatsächlich bedeutend mehr (1062,5) diastatischer Einheiten enthält, als durch Wasser entziehbar ist, sie ergaben aber auch die überraschende Tatsache, *daß Gerste bedeutend mehr diastatische Einheiten enthält als an solchen dem aus ihr dargestellten Malz durch Wasser entzogen werden kann*, nämlich 1062,5 gegenüber 677.

Diese Tatsache wäre nun nicht schwer zu erklären: Das α-diastatische Agens ist, wie gesagt wurde, in der Gerste von irgendwelchen Eiweißsubstanzen ab- oder adsorbiert und wird erst durch Proteolyse derselben frei. Eine starke Papayotinlösung hydrolysiert sämtliche hier in Frage kommenden Eiweißsubstanzen und macht dadurch das sämtliche α-diastatische Agens frei, während der Mälzung aber, während welcher ebenfalls eine Proteolyse im Korne stattfindet und dadurch ein Mehr an α-diastatischem Agens auslaugbar wird, geht dieser Prozeß nicht so weit wie bei Anwendung von Papayotin, es wird deshalb auch nicht so viel an diastatischem Agens frei wie im letzteren Falle.

Ich sah jetzt ein, daß ich mich von der Größe der gesamten α-diastatischen Kraft sowohl der Gerste als auch des aus ihr hergestellten Malzes zwecks Gewinnung der rechnerischen Grundlagen zur Herstellung von künstlich gemischten $(\alpha + \beta)$-diastatischen Auszügen erst durch Auslaugen derselben mit papayotinhaltigem Wasser überzeugen konnte. Es war deshalb notwendig, noch zu untersuchen, welche Mengen an α-diastatischem Agens durch papayotinhaltiges Wasser aus Malz auslaugbar sind.

g) Einfluß von Papayotin auf das Ergebnis der Extraktion von Malzmehl im Vergleich mit dem von Gerstenmehl. Es wurden 2000 Gerstenkörner abgezählt (sie wogen 69,4 g) und auf einer Kaffeemühle fein gemahlen. Aus einer weiteren Portion der nämlichen Gerste wurde ein zehntägiges Malz hergestellt und dann an der Luft getrocknet. Von diesem Malz wurden nur 2000 *wirklich gekeimte* Körner abgezählt und ebenfalls zu Mehl vermahlen; dieses Malzmehl wog 58,5 g.

25 g Gerstenmehl wurden mit 150 ccm Wasser durch 9 Stunden unter fortwährendem Quirlen ausgelaugt. Die diastatische Kraft dieses Auszugs war $D_\alpha = 325$.

25 g des gleichen Gerstenmehls wurden mit 150 ccm einer 1 proz. wässerigen Papayotinlösung ebenfalls durch 9 Stunden ausgelaugt. D_α dieses Auszugs war 1062,5.

Nun wurden 21,8 g[1]) des Malzmehls mit 150 ccm reinen Wassers durch 9 Stunden unter Quirlen ausgelaugt. Die diastatische Kraft dieses Auszugs, also $D_{(\alpha + \beta)}$, war 937,5.

50 ccm des Auszugs wurden durch 20 Minuten auf 61° erhitzt. Im abgekühlten und filtrierten Auszug wurde die diastatische Kraft, die wohl

[1]) Diese Menge entsprach den ursprünglichen 25 g Gerste, aus der das Malz hergestellt wurde.

die zu etwa 80 Proz. übriggebliebene β-Kraft vorstellte, bestimmt; sie betrug 375 Einheiten. Die ganze (100 Proz.) β-diastatische Kraft hat somit vor der Erhitzung 469 Einheiten betragen. Es ist daraus zu schließen, daß die α-diastatische Kraft des ursprünglichen, nicht erhitzt gewesenen Malzauszugs, also $D_\alpha = 937{,}5 - 469 = 468{,}5$ Einheiten betragen hat.

Es wurden jetzt 21,8 g[1]) des Malzmehls mit 150 ccm einer 1 proz. wässerigen Papayotinlösung durch 9 Stunden ausgelaugt. $D_{(\alpha+\beta)}$ des filtrierten Auszugs betrug 1187,5 Einheiten.

Auf die nämliche Weise, wie beim rein wässerigen Auszug wurde D_β bestimmt; es betrug 469 Einheiten, woraus zu schließen ist, daß D_α des mit Papayotinlösung erhaltenen Auszugs $1187{,}5 - 469 = 718{,}5$ Einheiten betragen hat.

Zusammengestellt sind obige Ergebnisse übersichtlicher:

Gerste:

a) Im wässerigen Auszug	D_α	=	325	diastatische	Einheiten.
b) Im Papayotinauszug	D_α	=	1062,5	„	„

Malz:

a) Im wässerigen Auszug	$D_{(\alpha+\beta)}$	=	937,5	diastatische	Einheiten.
	D_β	=	469	„	„
	D_α	=	468,5	„	„
b) Im Papayotinauszug	$D_{(\alpha+\beta)}$	=	1187,5	„	„
	D_β	=	469	„	„
	D_α	=	718,5	„	„

Aus dieser Zusammenstellung ist nun unter anderem auch nachfolgendes ersichtlich:

1. Durch Einwirkung von Papayotin auf Malzmehl werden bedeutend mehr diastatische Einheiten extrahierbar (nämlich $1187{,}5 - 937{,}5 = 250$) als durch reines Wasser allein.

2. An β-diastatischen Einheiten gibt das Malzmehl aber sowohl an reines Wasser als auch an eine Papayotinlösung gleiche Mengen, nämlich 469, ab, so daß die oben festgestellte Vergrößerung der enzymatischen Wirkung ausschließlich von der α-diastatischen Kraft herrührt.

3. In der der ursprünglichen Gerstenmenge entsprechenden Menge Malz sind bedeutend weniger (nämlich um $1062{,}5 - 718{,}5 = 344$ weniger) α-diastatischer, mittels Papayotin auslaugbarer Einheiten enthalten.

Auf Grund obiger Ergebnisse gelangte ich zu der Erkenntnis, daß α-Diastase dem rohen Korne durch Wasser nur zum Teil (im gegebenen Falle zu etwa 30 Proz.) entzogen werden kann; der weit überwiegende Teil (69 bis 70 Proz.) verbleibt im Korne und wird erst durch einen proteolytischen Prozeß frei.

---

[1]) Diese Menge entsprach den ursprünglichen 25 g Gerste, aus der das Malz hergestellt wurde.

Die zu Anfang dieses Kapitels entstandene Frage, ob das im wässerigen Malzauszuge vorgefundene Mehr an α-diastatischer Kraft, im Vergleich mit der der Gerste, aus dem rohen Korne noch stammt oder aber im Malze neben der β-diastatischen Kraft vollkommen neu gebildet wird, ist durch dieses Experiment nicht nur dahin entschieden worden, *daß sie noch aus dem rohen Korne stammt und nur durch die auch im Malze während des Wachsens stattfindende Proteolyse so weit frei wird, daß sie in den Auszug übergeht,* sondern es ergab sich jetzt, daß von der anfangs im rohen Korne vorhandenen gesamten α-Diastase durch das Mälzen zwar eine größere Menge „wasserlöslich" wird, *daß sich jedoch ein Teil dieses gesamten Enzyms im Malze nicht mehr als α-Diastase offenbart, sondern als solche in ihm aufgehört hat zu bestehen, also aus ihm verschwunden ist, und daß jetzt das β-diastatische Vermögen erscheint.*

Die Erörterung der Frage darüber, was beim Mälzen aus der verschwundenen α-diastatischen Kraft geworden ist, behalte ich mir für eine der nächsten Abhandlungen vor; an dieser Stelle will ich nur erwähnen, daß hier auch nachfolgende zwei Möglichkeiten ins Auge gefaßt werden können: Entweder wird α-Diastase veratmet und β-Diastase entsteht hiervon unabhängig aus einem vorher diastatisch unwirksam gewesenen Bestandteil des Gerstenkorns, *oder aber erleidet die α-Diastase während des Wachstums des Gerstenkorns irgend eine Umwandlung und wird zu β-Diastase.*

Die beschriebenen Experimente haben mich darüber belehrt, auf welche Weise ich Kenntnis vom gesamten α-diastatischen Vermögen der Gerste und dem α- sowie β-diastatischen Vermögen eines Malzes erlangen könnte, um, mich auf diese Kenntnisse stützend, einen in betreff der beiden diastatischen Kräfte dem natürlichen Malzauszug gleich zusammengesetzten Auszug künstlich zusammenmischen zu können. Da mir aber jetzt zur Lösung der Frage, ob das im erhitzt gewesenen Malzauszug übrig bleibende β-diastatische Vermögen einer natürlichen Diastase oder einem Kunstprodukt zuzuschreiben ist, auch ein Vergleich von solchen diastatisch wirkenden Auszügen genügen könnte, die nicht gerade sämtliche Diastase des Gersten- bzw. Malzkornes in sich aufgenommen haben, wenn sie nur, nicht nur was die beiden diastatischen Kräfte anbelangt, sondern auch in bezug auf die übrigen in ihnen vorhandenen Substanzen möglichst gleich zusammengesetzt wären, so sah ich von der Anwendung von Papayotinlösung zur Herstellung der Auszüge ab und beschloß, hierzu nur reines Wasser zu gebrauchen; hierbei ließ ich mich noch von der Überlegung leiten, daß Papayotin eine gersten- bzw. malzfremde Substanz ist und eine Zumischung derartiger Substanzen das Ergebnis des späteren Experiments verschleiern könnte.

Die Herstellung von gleichdiastatischen, einerseits künstlich zusammengemischten, andererseits natürlichen Auszügen geschah wie folgt:

Es wurden vor allem folgende Auszüge hergestellt:

a) Ein wässeriger Gerstenauszug.

b) Ein ebensolcher Auszug, in dem aber das enzymatische Agens durch Aufkochen getötet wurde.

c) Ein wässeriger Malzauszug.

d) Ein ebensolcher Auszug, der durch 20minutiges Erhitzen auf 60 bis 61° bloß β-diastatisch wirkend gemacht wurde.

e) Ein wässeriger Malzauszug, dessen enzymatisches Vermögen durch Aufkochen völlig getötet wurde.

Sämtliche Auszüge wurden blank filtriert und in den noch wirksamen die diastatischen Kräfte bestimmt.

Die Berechnung der zusammenzumischenden Mengen geschah auf Grund nachfolgender Erwägungen:

Es seien:

die α-diastatische Kraft des frischen Malzauszugs . . . . $= m$
„ β- „ „ „ „ „ . . . . $= n$
„ α- „ „ „ Gerstenauszugs . . . . $= o$
„ β „ „ „ auf 60° erhitzt gewesenen Auszugs . . . $= p$

Wenn wir dem frischen Malzauszug die Menge M (in Kubikzentimetern) entnehmen zur weiteren Verwendung, so enthält sie:

mM α-diastatischer (ccm)-Einheiten und
nM β- „ „

Um nun im künstlich zusammenzumischenden Auszug die gleiche Menge von α- bzw. β-Einheiten zu haben, ist es dann nötig, nachfolgende Mengen in Kubikzentimetern) der Auszüge zu nehmen:

$M_1 = m/oM$ des Gerstenauszugs und
$M_2 = n/pM$ des auf 60° erhitzt gewesenen Malzauszugs.

Nach dem Zusammenmischen der beiden letzteren Auszüge erhalten wir die Summenmenge $M_1 + M_2$, die der Menge M des natürlichen Auszugs selbstverständlich nicht gleich sein wird; wir müssen deshalb die Menge M dieses Auszugs um so viel ergänzen, daß sie der Menge der künstlichen Mischung gleich wird.

Es ist hier nicht von der Hand zu weisen die Annahme, daß die nicht diastatischen Substanzen der Auszüge auf die Wirksamkeit der beiden diastatischen Kräfte irgend einen fördernden oder auch hemmenden Einfluß ausüben werden, und zwar vielleicht die des Gerstenauszugs einen anderen als die des Malzauszugs, man muß deshalb Vorsorge treffen, daß in dieser Hinsicht beide zu vergleichenden Auszüge möglichst gleichgestellt werden. Die Ergänzung der Malzauszugsmenge werden wir deshalb nicht mit reinem Wasser, sondern teils mit totem Gersten-, teils mit ebensolchem Malzauszug[1]) vornehmen, wobei die Mengen dieser Zumischungen so zu bemessen sein werden, daß in den beiden zu vergleichenden Auszügen gleiche Mengen

[1]) Freilich ist ein toter Auszug einem frischen nicht vollkommen gleich, da aus ihm eine gewisse Menge von koagulierten Substanzen ausgeschieden wurde; es ist jedoch anzunehmen, daß diese Substanzen auf Diastase keine Wirkung haben werden.

von außerdiastatischen Gerstenauszugs- und gleiche von ebensolchen Malzauszugssubstanzen vorhanden sind.

Es sei nun: x die hinzuzusetzende Menge des toten Gerstenauszugs und y die hinzuzusetzende Menge des toten Malzauszugs.

Die beiden müssen nachfolgenden Bedingungen genügen:

$$M_1 + M_2 = M + x + y \text{ und } \frac{M_1}{M_2} = \frac{x}{M + y},$$

woraus dann folgt

$$x = M_1 \text{ und } y = M_2 - M,$$

was übrigens durch einfache Überlegung ebenfalls herauszubringen gewesen wäre.

$D_{(\alpha + \beta)}$ des frischen Malzauszugs war 1375.
D_β des auf 60° erhitzt gewesenen Malzauszugs war 437,5.
D_β des nicht erhitzten Malzauszugs war somit $^5/_4 \cdot 437{,}5 = 546{,}5$.
D_α des frischen Malzauszugs war also $1375 - 546{,}5 = 828{,}5$.
D_α des Gerstenauszugs war 187,5.

Es war somit zu setzen:

$m = 828{,}5$
$n = 546{,}5$ und daraus $m/o = 4{,}41$; $n/p = 1{,}25$
$o = 187{,}5$
$p = 437{,}5$

An frischem Malzauszug nahm ich die Menge $M = 100$ ccm, zu den Mischungen mußte ich also folgende Mengen nehmen:

$M_1 = m/o\, M = 441$ ccm (Gerstenauszug.
$M_2 = n/p\, M = 125$ ccm (auf 60° erhitzt gewesener Malzauszug).
$x = M_1 = 441$ ccm (toter Gerstenauszug).
$y = M_2 - M = 25$ ccm (toter Malzauszug).

Die künstliche $(\alpha + \beta)$-diastatische Mischung sollte somit $M_1 + M_2 = 566$ ccm betragen, und ebensoviel die nicht denaturierte $(\alpha + \beta)$-diastatische Mischung, d. i. der verdünnte Malzauszug selbst.

Die Mischungen wurden hergestellt. Bevor ich jedoch zum Vergleich ihres Verhaltens Stärkelösung und höherer Temperatur gegenüber schritt, bestimmte ich, zur Kontrolle der richtigen Herstellung der Mischungen, ihre diastatischen Gesamtkräfte. Es war leicht zu berechnen, daß diese Kräfte, die in beiden Mischungen selbstverständlich gleich sein mußten, 243 Einheiten betragen sollten.

Das Experiment ergab nun:

In der undenaturierten Mischung (Malzauszug) $D_{(\alpha + \beta)} = 237{,}5$,
in der künstlichen Mischung $D_{(\alpha + \beta)} = 275$.

Bei Berücksichtigung der bei der *Lintner*schen Methode möglichen Fehlergröße entsprach $D_{(\alpha + \beta)}$ der nicht denaturierten Mischung der berechneten Zahl vollkommen, das der künstlichen Mischung war aber sichtlich größer.

Als noch weitere zwei Versuche mit immer von neuem hergestellten Auszügen von anderen Gersten und anderen Malzen zeigten, daß die künstliche Mischung immer eine größere diastatische Kraft aufwies, als nach der Berechnung zu erwarten war, während die natürlichen Mischungen die berechneten Kräfte tatsächlich hatten, sah ich ein, daß der festgestellte Unterschied keinem Versuchsfehler, wie ich anfangs

dachte, entstammte und nur einer falschen Berechnung der künstlich zusammenzumischenden Mengen der Auszüge zuzuschreiben war.

Eine solche Berechnung konnte nur von der Unrichtigkeit der Zahlen m oder n herrühren, da die beiden anderen Zahlen o und p direkt experimentell bestimmt worden waren, sie aber durch Schlußfolgerung ermittelt wurden.

Was die Zahl n anbelangt, wurde angenommen, daß ebenso wie der 20 Minuten auf 60⁰ erhitzte, nur β-diastatische Auszug im auf S. 99 angeführten Experiment, etwa 20 Proz. seiner β-diastatischen Kraft einbüßte, so auch wohl der hier angewandte Malzauszug durch ein ebensolches Erhitzen eine prozentual gleiche Einbuße an seiner β-diastatischen Kraft erlitt, daß er somit im frischen Zustande $^5/_4$ jener Kraft besessen haben mußte, die er nach dem Erhitzen noch behalten hatte, das ist $^5/_4\,p$. Nun konnte es aber sein, was das spätere Experiment auch bestätigte, daß beim Erhitzen auf 60^0 nicht immer 20 Proz. der ursprünglichen β-diastatischen Kraft vernichtet werden, sondern daß hierbei außer der Temperatur auch verschiedene Substanzen (saurer usw. Natur), die den betreffenden Gersten und den verschieden hergestellten und verschieden alten Malzen eigentümlich sind, vernichtend und dann in verschiedenem Grade wirken, daß somit hierbei auch andere prozentuale Mengen an β-Diastase vernichtet werden. Um ein richtiges n zu haben, beschloß ich, von nun an seine Bestimmung nachfolgend vorzunehmen: Ein Teil des Malzauszuges wird durch Erhitzen nur β-diastatisch gemacht und seine Kraft hieraus bestimmt. Bei Erhitzung der Hauptportion auf 60^0 zwecks Herstellung des für die Mischung notwendigen β-diastatischen Auszuges wird gleichzeitig und unter vollkommen gleichen Bedingungen der früher einmal erhitzt gewesene und deshalb jetzt nur rein β-diastatische Auszug von bereits bekannter Kraft von neuem erhitzt, um zu bestimmen, welche prozentuale Menge an β-Diastase er hierbei verloren hat, und daraus dann geschlossen, welche Menge an β-diastatischen Krafteinheiten der frische Malzauszug bei derselben Erhitzung eingebüßt hat, wie groß somit das ursprüngliche $D_\beta = n$ war.

Die Zahl m wurde bisher durch nachfolgende Schlußfolgerung ermittelt: Wenn $D_{(\alpha+\beta)}$ des frischen Malzauszuges 1375 Einheiten beträgt und D_β dieses Auszuges gleich 546,5 ist, dann muß D_α des Auszuges gleich dem Unterschied dieser beiden Größen, also gleich 828,5 sein. Hier konnte ein Fehler begangen worden sein, da bei dieser Schlußfolgerung stillschweigend, als selbstverständlich, die Voraussetzung gemacht worden war, daß die Verzuckerungskraft des Malzauszuges gleich ist der algebraischen Summe der Größen beider in ihm vorhandenen diastatischen Kräfte. Wenn man jedoch den Fall annimmt, daß sich die beiden Kräfte irgendwie beeinflussen, so ist die obige Vor-

aussetzung falsch und dann, selbstverständlich, unrichtig die Berechnung des D_α des Malzauszuges (= m), somit auch unrichtig die Berechnung der zusammenzumischenden Mengen der Auszüge. Ich wurde daher gezwungen, Vorversuche darüber anzustellen, ob und inwieweit die eine Art der diastatischen Wirkung die Tätigkeit der anderen Diastase beeinflußt.

Es wurde ein α-diastatischer Gerstenauszug hergestellt. Sein D_α betrug 137,5 Einheiten. Ein durch 20minutiges Erhitzen auf 60° rein β-diastatisch gemachter Malzauszug wies ein D_β von 387,5 Einheiten auf. Außerdem wurde ein toter Gerstenauszug durch Aufkochen und Filtrieren des frischen hergestellt. Es wurden dann nachfolgende Mischungen zusammengesetzt:

1. 30 ccm des β-diastatischen Auszugs + 0 ccm des α-diastatischen Auszugs
2. 30 " " " " + 10 " " " "
3. 30 " " " " + 20 " " " "
4. 30 " " " " + 30 " " " "
5. 30 " " " " + 40 " " " "
6. 30 " " " " + 50 " " " "

Jede mit totem Gerstenauszug zu 100 ccm aufgefüllt.

In jeder dieser Mischungen wurde die diastatische Gesamtkraft bestimmt und das Ergebnis mit der berechneten Summe der zusammengemischten Einzelkräfte verglichen. Die Resultate bringt folgende Tabelle:

Nr. der Mischung	$D(\alpha + \beta)$ berechnet	$D(\alpha + \beta)$ bestimmt	Nr. der Mischung	$D(\alpha + \beta)$ berechnet	$D(\alpha + \beta)$ bestimmt
1	23,25	24,0	4	31,50	33,0
2	26,00	25,5	5	34,25	39,0
3	28,75	28,5	6	37,00	47,5

Es ergab sich, daß, vom Versuch 4 angefangen, die tatsächlich ermittelte Gesamtkraft größer ist, als die berechnete Summe der Einzelkräfte, woraus dann klar folgt, daß die früher hergestellten Mischungen falsch zusammengesetzt worden waren.

Um sie richtig zusammensetzen zu können, mußte ich vorerst das Gesetz kennenlernen, nach welchem diese gegenseitige Beeinflussung der beiden Kräfte stattfindet. Es sollten die diastatischen Kräfte, in möglichst vielen Verhältnissen zusammengemischt, auf ihre Summenkraft untersucht werden.

Zu den weiteren Versuchen wurde eine Gerste des Jahrgangs 1919 von 100 Proz. (!!) Keimkraft verwendet. Ein Teil der Gerste wurde vermälzt. Die Weiche dauerte 55 Stunden bei 12°, das Keimen 12 Tage, und wurde es im Eiskasten bei + 7,5° durchgeführt. Das Malz wurde an der Luft bei 18° durch 6 Tage getrocknet.

Aus der Gerste wurde ein Doppelauszug hergestellt: 1 Teil feinen Gerstenschrotes wurde mit 5 Teilen Wasser am ersten Tage durch 9 Stunden ausgelaugt; am nächsten Tage wurde eine gleiche Menge frischen Gerstenschrotes einer neunstündigen Auslaugung mittels des mittlerweile erhaltenen Filtrats vom vorigen Tage unterworfen. Aus dem geschroteten Luftmalz wurde mittels Wassers im Verhältnis von 1 : 5 ebenfalls ein Auszug bereitet.

Nach dem Beginn des Quirlens während der Auslaugung sowohl des Gersten- als auch des Malzschrotes wurde auf je 1000 ccm Wasser 1 ccm

Toluol hinzugesetzt. Nach dem Filtrieren erhielten die Auszüge nochmals Toluol, und zwar 0,5 ccm auf je 1000 ccm.

Der Malzauszug wurde auf Erlenmeyerkölbchen zu je 50 ccm verteilt und durch 20 Minuten im Thermostaten auf 60 bis $60\frac{1}{4}^0$ erhitzt, darauf nach Abkühlung filtriert.

Ein Teil des Gerstenauszugs wurde aufgekocht und filtriert.

D_α des Gerstenauszugs war 625, D_β des erhitzt gewesenen Malzauszugs war 1400.

Es wurden nun Mischungen der Auszüge hergestellt und ihre diastatischen Kräfte bestimmt. Die Ergebnisse sind in nachfolgender Tabelle zusammengestellt:

Versuchs-Nr.	1	2	3	4	5	6	7	8		9	10
	Es wurden zusammengemischt					Proz. α-diastatische Einheiten, wenn die β-diastatischen = 100 gesetzt werden	$D(\alpha+\beta)$ der Mischung			$D(\alpha+\beta)$ d. unverdünnt. Mischung berechnet auf D_β = 280 in 100 ccm	Proz. der gefundenen $(\alpha+\beta)$-diastatischen Kraft, wenn die β-diastatische = 100 gesetzt wird
	ccm			diastatische ccm Einheiten			berechnet in Einheiten	gefunden			
	des β. diastatischen Auszugs	des α. diastatischen Auszugs	des O. diastatischen Auszugs	β	α			in der Verdünnung	in Einheiten		
1	20	10	Mit totem (α-diastatischem) Auszuge zu 100 ccm ergänzt	280	62,5	22,3	342,5	1 : 5	75,0	375	133,9
2	20	20		280	125,0	44,6	405,0	1 : 10	42,5	425	151,8
3	20	30		280	187,5	66,9	467,5	1 : 10	50,0	500	185,7
4	20	40		280	250,0	87,2	530,0	1 : 10	85,0	850	303,5
5	20	50		280	312,5	111,5	592,5	1 : 20	50,0	1000	357,1
6	20	60		280	375,0	133,8	655,0	1 : 20	52,5	1050	375,0
7	20	70		280	437,5	156,1	717,5	1 : 20	55,0	1100	392,8
8	20	80		280	500,0	178,4	780,0	1 : 20	60,0	1200	428,5
9	10	50		140	312,5	223,2	452,5	1 : 20	42,5	1700	607,1
10	10	60		140	375,0	267,8	515,0	1 : 20	52,5	2100	750,0
11	10	70		140	437,5	312,5	577,5	1 : 20	58,0	2320	828,5
12	10	80		140	500,0	357,1	640,0	1 : 20	62,5	2500	892,8
13	10	90		140	562,5	401,4	702,5	1 : 20	65,0	2600	928,5
14	5	60		70	375,0	535,7	445,0	1 : 10	80,0	3200	1142,8

Aus den Zahlen obiger Tabelle läßt sich nun nachfolgende graphische Darstellung des Verlaufs der gegenseitigen Beeinflussung der in verschiedenen Verhältnissen zusammengemischten beiden diastatischen Kräfte konstruieren:

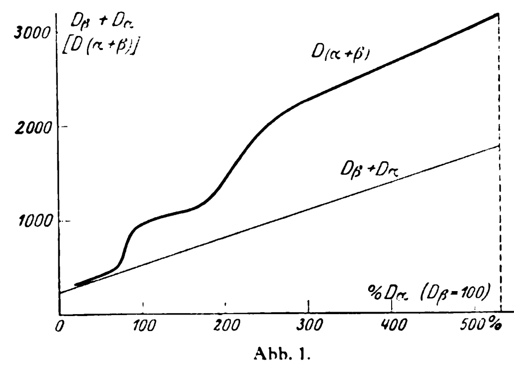


Abb. 1.

Auf der Abszissenachse tragen wir die Zahlen der sechsten Kolonne auf, auf der Ordinate einmal die Zahlen der Kolonne 7, dann bekommen wir die Gerade *ab*, die uns das Anwachsen der algebraischen Summe der beiden zusammengemischten diastatischen Kräfte darstellt, das andere Mal die Zahlen der Kolonne 9, dann bekommen wir die Kurve, welche uns graphisch das Gesetz des scheinbar unregelmäßigen Anwachsens der Gesamtkraft der Mischung mit dem prozentualen Anwachsen der α-Kraft in ihr darstellt.

Wenn wir nun zweckmäßigkeitshalber im Punkte 535,7 auf die Abszissenachse eine Senkrechte errichten und ihren bis zum Durchschnitt mit der Kurve reichenden Abschnitt in 1142,8 Teile teilen, dann können wir mit Hilfe dieser Teilung jene Punkte auf der Kurve aufsuchen, die den wirklichen Verzuckerungskräften $(\alpha + \beta)$-diastatisch verschieden zusammengesetzter Mischungen entsprechen. Wir bestimmen experimentell die $(\alpha + \beta)$-diastatische und die β-diastatische Kraft der Mischung, suchen den betreffenden Punkt auf der Kurve auf, fällen eine Senkrechte auf die Abszissenachse und bekommen im Fußpunkt dieser Senkrechten die Zahl, welche uns das prozentuale Verhältnis des α-diastatischen, zur bereits bekannten β-diastatischen Kraft der Mischung angibt.

Es wurden jetzt von neuem zwei miteinander zu vergleichende diastatische Mischungen hergestellt:

Aus *derselben Gerstenprobe*, welche zu obigem Versuch verwendet wurde, wurde ein Doppelauszug bereitet. Sein D_α betrug 525 Einheiten. Ebenso wurde ein Auszug aus einer weiteren Portion des beim vorigen Versuch verwendeten Malzes hergestellt. Sein $D_{(\alpha + \beta)}$ war 2360.

Es wurden jetzt 100 ccm des Malzauszugs im Thermostaten durch 20 Minuten auf 60 bis 60½° erhitzt; das α-diastatische Vermögen somit vernichtet. D_β dieses Auszugs war 1280.

Nachdem das D_β dieses Auszugs bestimmt worden war, wurde die Hauptportion des Malzauszugs zu je 50 ccm auf sieben Kölbchen verteilt, sowie 50 ccm des bereits einmal erhitzt gewesenen Malzauszugs (von D_β = 1280) in ein gleiches Kölbchen getan, und sämtliche Kölbchen in demselben Thermostaten gleichzeitig während 20 Minuten auf 60 bis 60½° erhitzt. Nach dem Abkühlen und Filtrieren wurden die D_β einerseits in der Hauptportion, andererseits in dem zum zweiten Male erhitzt gewesenen Auszuge bestimmt.

D_β der Hauptportion war 1200.

D_β der zweimal erhitzten Portion war 830.

Die letztere Portion hatte also von seinen früheren D_β (= 1280) 450 Einheiten eingebüßt. Die unter völlig identischen Verhältnissen erhitzt gewesene Hauptportion hat, so ist anzunehmen, prozentual ebensoviel an β-diastatischer Kraft verloren; das D_β des ursprünglichen Malzauszugs hat somit 1850,6 Einheiten betragen.

Es wird jetzt berechnet, daß $D_{(\alpha+\beta)}$ des Malzauszugs (2360) 127,5 Proz. des D_{β_1} dieses Auszugs beträgt. Mit Hilfe dieser Zahl suchen wir den betreffenden Punkt auf der Kurve auf und finden dann nach Fällung der Senkrechten auf die Abszissenachse, daß die α-diastatische Kraft des Malzauszugs 18 Proz. des tatsächlichen D_β ausmacht, somit 333,1 Einheiten beträgt.

Wir haben nun:

$$\left.\begin{aligned} m &= 333{,}1 \\ n &= 1850{,}6 \\ o &= 525 \\ p &= 1200 \end{aligned}\right\} \text{ somit } m/o = 0{,}634 \text{ und } n/p = 1{,}542.$$

Wenn man zur Herstellung der nicht denaturierten Auszugsmischung 100 ccm ($= M$) des Malzauszugs nimmt, so muß $M_1 = 63{,}4$ ccm und $M_2 = 154{,}2$ ccm betragen. Dann ist $x = 63{,}4$ ccm und $y = 54{,}2$ ccm. Es wurde die nicht denaturierte Mischung $M + x + y$ und die künstliche $M_1 + M_2$ zusammengesetzt; jede hatte das Volumen von 217,6 ccm.

Die diastatische Gesamtkraft beider Mischungen sollte nach der Berechnung 1084,5 Einheiten betragen; die Bestimmung ergab:

In der Verdünnung 1 : 20:

bei $M + x + y$	57,5 Einheiten
„ $M_1 + M_2$	61,5 „

somit unverdünnt:

bei $M + x + y$	1150 Einheiten
„ $M_1 + M_2$	1230 „

Wenn man bedenkt, daß bei der *Lintner*schen Bestimmung der diastatischen Kraft ein normaler Fehler von mindestens 2,5 Einheiten mit in den Kauf genommen werden muß und daß dann bei der Aufsuchung des betreffenden Punktes auf der Kurve, die ebenfalls mit entsprechend großen Fehlern behaftet ist, ein weiterer Fehler begangen wird, was dann seinen Einfluß auf die Zusammensetzung der künstlichen Mischung ausüben muß, so ist die Zahl 1230 als mit der berechneten genügend übereinstimmend zu betrachten.

B. Vergleichung der Mischungen.

a) Verhalten einer Stärkelösung gegenüber. Es wurden 20 g lufttrockener *Lintner*scher Stärke zu 1000 ccm in Wasser gelöst. Die Lösung enthielt in 100 ccm 1,6333 g Trockensubstanz.

Je 30 ccm der beiden Auszugsmischungen wurden mit Wasser zu je 100 ccm ergänzt und in dieser Verdünnung zum Verzuckerungsversuch angewendet. Je 300 ccm der oben genannten Stärkelösung wurden mit 10 ccm der betreffenden Auszugsmischung versetzt und zu 500 ccm ergänzt. Von Zeit zu Zeit wurden zur Bestimmung des wachsenden Reduktionsvermögens der Lösungen einer jeden 20 ccm entnommen. Zur Bestimmung des Jodfärbungsvermögens wurden aus Büretten je 1 ccm der verzuckernden Lösung zu einer Mischung von 5 ccm Wasser und 6 ccm einer n/100 Jodlösung hinzugefügt. Die erhaltenen Resultate sind in nachfolgender Tabelle zusammengestellt:

Verzuckerungsdauer in Min.	Verzuckert mittels der natürlichen Mischung $M + x + y$				Verzuckert mittels der künstlichen Mischung $M_1 + M_2$			
	Cu-Menge g	Maltose-menge g	Maltose Proz.	Jodfärbung	Cu-Menge g	Maltose-menge g	Maltose Proz.	Jodfärbung
10	0,0302	0,0255	13,01	blau	0,0408	0,0347	17,70	blau
20	—	—	—	"	—	—	—	"
30	0,0535	0,0457	23,31	"	0,0551	0,0471	24,03	"
40	—	—	—	"	—	—	—	erste Spur einer violetten Farbe
50	—	—	—	"	—	—	—	
60	0,0787	0,0678	34,59	erste Spur einer violetten Farbe	0,0793	0,0683	34,84	ausdrücklich violetter Stich
70	—	—	—		—	—	—	violett
80	—	—	—		—	—	—	karmoisinrot
90	0,1073	0,0931	47,50	ausdrücklich violetter Stich	0,1115	0,0972	49,59	
100	—	—	—		—	—	—	braun
110	—	—	—	violett (stark)	—	—	—	
120	0,1306	0,1140	58,16	karmoisinrot	0,1353	0,1182	60,30	
130	—	—	—		—	—	—	schwach braun
140	—	—	—	braun	—	—	—	
150	0,1471	0,1288	65,71		0,1546	0,1356	69,18	
160	—	—	—		—	—	—	
170	—	—	—		—	—	—	
180	0,1562	0,1370	69,89		0,1601	0,1405	71,68	
190	—	—	—	schwach braun	—	—	—	
200	—	—	—	immer schwächer braun	—	—	—	Spuren einer Färbung
210	0,1606	0,1410	71,93		0,1643	0,1443	73,62	keine Färbung

Die aus obigen Zahlen konstruierten Verzuckerungskurven haben nachfolgende Gestalt:

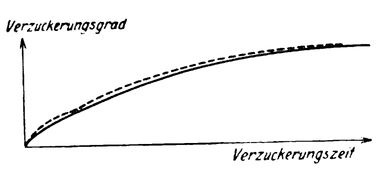


Abb. 2.

Die voll ausgezogene Kurve stellt den Verzuckerungsverlauf mittels der nicht denaturierten Mischung $M + x + y$ vor, die punktierte den mittels der künstlichen Mischung $M_1 + M_2$.

Aus dieser graphischen Darstellung der Parallelverzuckerung unter völlig gleichen Bedingungen ist es zur Genüge ersichtlich, daß die Verzuckerung der Stärkelösung mittels beider Mischungen der diastatischen Kräfte den gleichen Verlauf hat. Der Umstand, daß sich die Kurven nicht absolut decken, ist vollkommen erklärlich: Das künstliche Gemisch erhielt infolge von Experimentalfehlern etwas mehr an β-diastatischer Kraft zugemischt, was sich dann auch darin offenbart hat, daß in der mit diesem Gemisch verzuckerten Lösung die Änderung des Jodfärbungsvermögens schon nach der ersten Stunde um 20 Minuten vorauseilte und später um 30 Minuten und auch mehr.

b) Verhalten bei höherer Temperatur. Es wurden beide Mischungen einer gleichzeitigen Erhitzung auf 55° bei absolut gleichen Bedingungen unterworfen. Obige Temperatur wurde in Erwägung des Umstandes gewählt, daß bei ihr sowohl die α- als auch die β-Kraft ziemlich langsam vernichtet werden, so daß sich der Versuch auf eine längere Zeitdauer ausdehnen läßt.

Die erhaltenen Resultate bringt folgende Tabelle:

Die Erhitzung auf 55° C dauerte Min.	$M + x + y$			$M_1 + M_2$		
	Diastatische Kraft bestimmt		Berechnet für den unverdünnten Auszug	Diastatische Kraft bestimmt		Berechnet für den unverdünnten Auszug
	in der Verdünnung	Einheiten		in der Verdünnung	Einheiten	
60	1 : 20	52,5	1050	1 : 20	49	980
120	1 : 20	45	900	1 : 20	40	800
180	1 : 20	79	790	1 : 20	76	760

Aus diesen Zahlen ist ersichtlich, daß sich beide Mischungen bei der Erhitzung im allgemeinen gleich verhalten haben.

Zusammenfassung der Untersuchungsergebnisse.

1. Es läßt sich zeigen, daß eine künstlich zusammengesetzte Mischung von α-diastatisch wirkendem Gerstenauszug und einem bloß β-diastatisch wirksam gemachten Malzauszug sich Stärkelösung und höheren Temperaturen gegenüber völlig gleich verhält, wie ein nicht denaturierter Malzauszug, woraus dann der Schluß zu ziehen ist, daß der letztere dieselben diastatischen Agenzien enthält wie die künstliche Mischung, das ist α- und β-Diastase, daß somit sowohl die α-Diastase der Gerste mit der α-Diastase des Malzes identisch ist, als auch die β-Diastase des erhitzt gewesenen Malzauszuges identisch ist mit der natürlichen β-Diastase des nicht erhitzt gewesenen, also nicht denaturierten Malzauszuges, und kein Kunstprodukt vorstellt.

2. α-Diastase ist ein carbonylhydrolytisch auf Stärke wirkendes Enzym, das in der Stärkemolekel jene Bindungen spaltet, mittels welchen die Maltosereste an den übrigen Rest der Molekel geknüpft sind; bei dieser Spaltung entsteht, wenn sie zu Ende ist, einerseits Maltose, andererseits ein sich mit Jod noch blau färbendes Dextrin, das *Fehling*sche Lösung nicht reduziert. Das Enzym wird in Gersten- und Malzauszügen durch 20 Minuten langes Erhitzen auf 60° vernichtet.

3. β-Diastase ist ein ebenfalls carbonylhydrolytisch auf Stärke wirkendes Enzym, das aber in der Stärkemolekel die Bindungen zerreißt, mittels welchen die Glucosereste jenes Teiles der Molekel zusammengehalten werden, der nach Abspaltung der Maltosereste als das sich mit Jod noch blau färbende Dextrin zurückbleibt; bei dieser Spaltung

ändert sich das Jodfärbungsvermögen der resultierenden Produkte über Violett, Rot und Braun bis zum Verschwinden der Farbe.

Das Enzym wird in Malzauszügen erst bei 80° vernichtet.

4. Gerste enthält bloß α-Diastase, und zwar zum geringeren Teil durch Wasser auslaugbar, zum größeren jedoch von irgendwelchen eiweißartigen Substanzen ab- oder adsorbiert.

5. Auslaugbar aus dem Korn wird sämtliche α-Diastase erst dann, wenn die sie ab- oder adsorbierenden Substanzen einer vollständigen Proteolyse anheimfallen; durch eine während des Mälzens stattfindende teilweise Proteolyse wird bloß ein Teil der α-Diastase in auslaugbaren Zustand übergeführt.

6. β-Diastase entsteht im Korn erst während des Mälzens; sie ist durch Wasser vollkommen auslaugbar. Während ihrer Entstehung verschwindet ein Teil der α-Diastase. Proteolytische Einwirkung auf α-Diastase läßt keine β-Diastase entstehen. [Es scheint mir am wahrscheinlichsten zu sein, daß β-Diastase aus α-Diastase entsteht, und zwar durch Oxydation[1])].

7. Malz enthält an diastatischem Agens nicht mehr als die betreffende Rohgerste, sondern im Gegenteil vielleicht weniger.

8. Die Gesamtverzuckerungskraft beider Diastasen ist, wenn sie zusammengemischt auf Stärke wirken, größer als die Summe der Verzuckerungskräfte der beiden Diastasen vor ihrer Mischung. Das Verhältnis dieser Gesamtkraft zur Summe der beiden einzelnen Kräfte ist, je nach dem prozentualen Verhältnis dieser Kräfte in der Mischung, verschieden.

---

[1]) Der Erörterung dieser Frage wird eine der nächsten Abhandlungen gewidmet sein.

Versuche über Glykolyse.

Von

Erwin Negelein.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 2. März 1925.)

Mit 1 Abbildung im Text.

Die vorliegende Arbeit, die auf Vorschlag von Herrn *Warburg* unternommen wurde, zerfällt in folgende Abschnitte:

I. Ist die Glykolyse durch Tumorgewebe eine reine Milchsäuregärung?
II. Messung der Glykolyse durch Bicarbonatbestimmungen.
III. Manometrische Messung der Glykolyse bei Gegenwart von Serum.
IV. Glykolytische Wirkung von Tumorgewebe in Serum.
V. Glykolyse im Blute.

Ich erinnere hierbei an die Bedeutung der Quotienten[1]:

$$Q_{O_2} = \frac{\text{cmm verbrauchten Sauerstoffs}}{\text{mgr Gewebe} \times \text{Stunden}} \text{ (Atmung).}$$

$$Q_{CO_2}^{O_2} = \frac{\text{cmm Extrakohlensäure, gebildet in Sauerstoff}}{\text{mgr Gewebe} \times \text{Stunden}}$$

(Glykolyse unter aeroben Bedingungen).

$$Q_{CO_2}^{N_2} = \frac{\text{cmm Extrakohlensäure, gebildet in Stickstoff}}{\text{mgr Gewebe} \times \text{Stunden}}$$

(Glykolyse unter anaeroben Bedingungen).

Statt Glykolyse unter aeroben Bedingungen sagen wir kurz: „aerobe Glykolyse", und statt Glykolyse unter anaeroben Bedingungen kurz: „anaerobe Glykolyse".

---

[1]) *O. Warburg*, Verbesserte Methode zur Messung der Atmung und Glykolyse, diese Zeitschr. **152**, 51, 1924.

I. Ist die Glykolyse durch Tumorgewebe eine reine Milchsäuregärung?

Minami[1]) hat gezeigt, daß die Zuckerspaltung durch Tumorgewebe im wesentlichen ein Zerfall von Hexose in zwei Moleküle Milchsäure ist. Ob aber hierbei, wie durch Milchsäurebazillen, *kleine* Mengen an Zucker auf anderem Wege gespalten werden, hat *Minamis* ziemlich rohe Versuchsanordnung noch nicht entschieden.

Ich habe die wichtige Frage auf doppelte Weise geprüft, nämlich erstens, indem ich die Abnahme des Bicarbonats in der Ringerlösung mit den erscheinenden Gasmengen verglich, zweitens, indem ich Zuckerverbrauch und ausgetriebene Kohlensäure verglich. Bei der ersten Anordnung mußten andere Gärungen (alkoholische Gärung, Buttersäuregärung) sich so geltend machen, daß *mehr* Gas erschien, als Kohlensäure aus dem Bicarbonat ausgetrieben wurde. Ich fand eine solche Diskrepanz nicht, sondern es erschien — innerhalb der Fehlergrenzen von etwa 3 Proz. — immer nur so viel Gas, als Kohlensäure aus dem Bicarbonat ausgetrieben war. Es entsteht also bei der Zuckerspaltung durch Tumorgewebe, innerhalb der genannten Fehlergrenzen, ausschließlich Milchsäure.

Hiernach muß für je zwei gebildete Milchsäuremoleküle ein Molekül Glucose aus der Ringerlösung verschwinden, falls der gesamte Zucker aus der Ringerlösung und nicht etwa zum Teil aus dem Zellinnern entnommen wird. Der Versuch ergab, daß — innerhalb der etwa 4 Proz. betragenden Fehlergrenzen — ein Molekül Zucker aus der Ringerlösung verschwindet, wenn zwei Moleküle Säure in der Ringerlösung erscheinen.

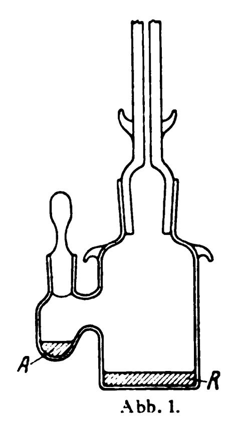


Abb. 1.

Dies gilt für das *Flexner-Jobling*sche Rattencarcinom, nicht aber für jedes Gewebe. So habe ich gefunden, daß der Hühnerembryo seinen glykolytischen Zuckerverbrauch nur zum Teil aus der umgebenden Ringerlösung bestreitet, zum Teil aber zelleigenes Kohlehydrat spaltet. Die Messung der Glykolyse durch Messung des Zuckerverbrauchs in der umgebenden Lösung liefert also nicht immer richtige Resultate.

Beschreibung der ersten Anordnung.

Ich verwendete vier Gefäße von der Form der Abb. 1, Nr. 0, 1, 2 und 3.

Gefäß 0 wurde in *R* mit 1 ccm Ringerlösung beschickt und diente als Thermobarometer.

---

[1]) *Seigo Minami*, diese Zeitschr. **142**, 334, 1923.

Gefäß 1 wurde in *R* mit 1 ccm Ringerlösung beschickt, in *A* mit 0,2 ccm 4proz. Citronensäure.

Gefäß 2 wurde in *R* mit 1 ccm Ringerlösung und einem Gewebeschnitt beschickt, in *A* mit 0,2 ccm 4proz. Citronensäure.

Gefäß 3 wurde beschickt wie Gefäß 2.

Die so vorbereiteten Gefäße wurden mit 5proz. Kohlensäure in Stickstoff gefüllt und im Thermostaten bei 37,5° 10 Minuten zwecks Temperatur- und Druckausgleichs geschüttelt. Die Zeit, zu der der Ausgleich beendet war, bezeichnen wir mit t^0.

Bei t^0 wurde die Citronensäure aus den Anhängen *A* der Gefäße 1 und 2 in den Raum *R* eingekippt, wobei die Kohlensäuremengen B_1 und B_2 im Gasraum erschienen und manometrisch gemessen wurden. Gefäß 3 wurde eine passende Zeit, etwa 1 Stunde, weitergeschüttelt, bis zur Zeit t', wobei der Druck *H* erschien. War *H* abgelesen, so wurde die Citronensäure aus dem Anhang *A* des Gefäßes 3 in den Raum *R* eingekippt, wobei die Kohlensäuremenge B_3 erschien.

Tabelle I.

*Flexner-Jobling*sches Carcinom. 37,5°. Gasraum 5 Proz. CO_2 in N_2.

	Gefäß 1	Gefäß 2	Gefäß 3
Volumina, ccm . . . Gefäßkonstanten . .	$v_F = 1{,}2$ $v_G = 18{,}8$ $K_{CO_2} = 1{,}72$	$v_F = 1{,}2$ $v_G = 19{,}6$ $K_{CO_2} = 1{,}79$	$v_F = 1{,}2$ $v_G = 18{,}0$ $K_{CO_2} = 1{,}65$
Im Hauptraum *R* . . Im Anhang *A*	1 ccm Ringerlösung, 0,2proz. Glucose. $C_{NaHCO_3} = 2 \cdot 10^{-2}$ Mole/Liter 0,2 ccm 4proz. Citronensäure		
Schnittgewichte, mg . .	—	3,01	2,88
Druckänderung beim Schütteln in der Zeit $t' - t^0 = 60$ Min.			$H = + 54{,}5$ mm $= 90$ cmm CO_2
Bestimmung der chemisch gebundenen Kohlensäure	Für $t = t^0$: + 251 mm = **481 cmm**	Für $t = t^0$: + 230 mm = **411 cmm**	Für $t = t'$: + 196 mm = **324 cmm** Chemisch gebund. Kohlensäure für $t = t^0$: $431 - \frac{2{,}88}{3{,}01} \cdot 20$ = **412 cmm** Abnahme d. chem. gebund. Kohlensäure in der Zeit $t' = t^0$: **412 − 324 = 88 cmm,** während **90 cmm** Kohlensäure beim Schütteln erschienen waren

Tabelle II.

Netzhaut der Ratte. 37,5°. Gasraum 5 Proz. CO_2 in N_2.

	Gefäß 1	Gefäß 2	Gefäß 3
Volumina, ccm . . .	$v_F = 1{,}2$ $v_G = 20{,}1$	$v_F = 1{,}2$ $v_G = 20{,}0$	$v_F = 1{,}2$ $v_G = 19{,}8$
Gefäßkonstanten . .	1,83	1,83	1,81
Im Hauptraum *R* . .	1 ccm Ringerlösung, 0,2 proz. Glucose. $C_{NaHCO_3} = 2 \cdot 10^{-2}$ Mole Liter		
Im Anhang *A*	0,2 ccm 4 proz. Citronensäure		
Gewicht, je 2 Netzhäute	—	3,30 mg	3,24 mg
Druckänderung in d. Zeit $t' - t^0$ = 75 Minuten			$H = + 129$ mm = 234 cmm CO_2
Bestimmung der chemisch gebundenen Kohlensäure	Für $t = t^0$: + 255 mm = **467 cmm**	Für $t = t^0$: + 222 mm = **407 cmm**	Für $t = t'$: + 97 mm = **176 cmm** Chemisch gebund. Kohlensäure zur Zeit t^0: $467 - \frac{3{,}24}{3{,}30} \cdot 60$ = **408 cmm** Abnahme d. chem. gebund. Kohlensäure in der Zeit $t' - t^0$: **232 cmm**, während **234 cmm** beim Schütteln erschienen waren

Waren die Druckmessungen beendigt, so wurden die Schnitte aus den Gefäßen 2 und 3 herausgenommen, bei 100° getrocknet und gewogen. Sind diese Gewichte bekannt — m_2 für Gefäß 2 und m_3 für Gefäß 3 —, so sind wir in der Lage, den Gehalt an chemisch gebundener Kohlensäure in Gefäß 3 zur Zeit t^0 zu berechnen, nach der Gleichung[1])

$$B_3^0 = B_1 - \frac{m_3}{m_2}(B_1 - B_2).$$

Ist nun während der Zeit $t' - t^0$ in Gefäß 3 kein anderes Gas erschienen als Kohlensäure, und stammt diese Kohlensäure ausschließlich aus chemisch gebundener Kohlensäure, so muß die Gleichung[2]) wahr sein:

$$H K_{CO_2} = B_3^0 - B_3, \qquad (1)$$

wo B_3^0 und B_3 in cmm Kohlensäure auszudrücken sind.

---

[1]) Denn es ist $B_1 - B_2$ gleich dem Bicarbonatverbrauch von m_2 während der Ausgleichszeit minus der in m_2 chemisch gebundenen Kohlensäure. $\frac{m_3}{m_2}(B_1 - B_2)$ dasselbe, umgerechnet auf das Gewicht m_3.

[2]) K_{CO_2} ist die „Gefäßkonstante für Kohlensäure" des Gefäßes 3.

Die Tabellen 1 und 2 enthalten je ein vollständiges Versuchsbeispiel für das *Flexner-Jobling*sche Rattencarcinom und die Netzhaut der Ratte und zeigen, daß die durch Gleichung (1) ausgedrückte Beziehung sehr nahe erfüllt ist. Die genannten Gewebe bilden also weder Wasserstoff noch Kohlensäure, sondern nur fixe Säure, die chemisch gebundene Kohlensäure austreibt.

Beschreibung der zweiten Anordnung.

Um den Zuckerverbrauch mit der entwickelten Kohlensäure zu vergleichen, brachte ich in Gefäße von der Form der Abb. 1 einen Gewebeschnitt und 1 ccm Ringerlösung, füllte in den Gasraum 5 Proz. Kohlensäure in Stickstoff und bestimmte den in 60 bis 100 Minuten auftretenden Kohlensäuredruck H.

War dies geschehen, so nahm ich den Schnitt aus dem Meßgefäß heraus, spülte ihn mit zuckerfreier Ringerlösung ab, vereinigte die Spülflüssigkeit mit der Ringerlösung und titrierte den Zucker nach der Methode von *Hagedorn-Jensen*[1]). Die Differenz des Zuckergehalts der Ringerlösung vor und nach dem Versuch ergab dann den Zuckerverbrauch des Schnittes.

Wird für je zwei Moleküle gebildeter Milchsäure ein Molekül Zucker aus der Ringerlösung herausgenommen, so entspricht die Zunahme des Kohlensäuredrucks um H mm einem Zuckerverbrauch von

$$\frac{1}{2} \cdot \frac{H \,.\, K_{CO_2}}{22400} \cdot 180 \,\text{mg}.$$

Dies ist der Zuckerverbrauch, der als „berechnet aus der Kohlensäureentwicklung“ in den Tabellen 3 und 4 angegeben ist. Wie man aus den Tabellen ersieht, stimmt der so berechnete Zuckerverbrauch mit dem nach *Hagedorn-Jensen* gefundenen für das *Flexner-Jobling*sche Rattencarcinom und die Netzhaut der Ratte auf einige Prozente überein.

Zuckerbestimmung nach Hagedorn-Jensen.

Die von den Autoren empfohlenen Lösungen stellte ich mir in folgenden Konzentrationen her:

1. Zinksulfatlösung zur Enteiweißung: 4,5 g $ZnSO_4\,7\,H_2O$ auf 1 Liter.
2. Alkalische Ferricyankaliumlösung: 3,29 g $K_3Fe(CN)_6 = {}^1/_{100}$ Mol und 10,6 g $Na_2CO_3 = {}^1/_{10}$ Mol auf 1 Liter.
3. Kaliumjodidlösung: 25 g KJ, 50 g $ZnSO_4\,7\,H_2O$, 250 g NaCl auf 1 Liter.
4. Thiosulfatlösung: n/100.
5. Stärkelösung: 10 g wasserlösliche Stärke, 300 g NaCl auf 1 Liter.

---

[1]) *Hagedorn-Jensen*, diese Zeitschr. **135**, 46, 1923.

Zur Bestimmung brachte ich die Ringerlösung aus dem Meßgefäß (1 ccm Ringerlösung, 4 ccm Spülflüssigkeit) in einen größeren Kolben, fügte 20 ccm „Zinksulfatlösung zur Enteiweißung" hinzu, 4 ccm n/10 Natronlauge, erhitzte 4 Minuten im siedenden Wasserbad, filtrierte durch ein eisenfreies Filter und spülte das Filter zweimal mit 8 ccm Wasser. Zu den vereinigten Filtraten gab ich 8 ccm der alkalischen Ferricyankaliumlösung, erhitzte 15 Minuten im siedenden Wasserbad, kühlte dann in Eiswasser auf Zimmertemperatur ab und fügte 3 ccm der Kaliumjodidlösung und 6 ccm 3 proz. Essigsäure hinzu. Nach Zusatz von einigen Tropfen Stärkelösung wurde das ausgeschiedene Jod mit n/100 Thiosulfat titriert.

Wurden Versuche mit Ringerlösungen von bekanntem Zuckergehalt ausgeführt, so zeigte der Verbrauch von 1 ccm der (m/100) Eisenlösung das Vorhandensein von 0,33 mg Glucose an, unabhängig davon, ob 1 ccm Ringerlösung 0,5, 1,0, 1,5 oder 2,0 mg Glucose enthielt. Größere Zuckermengen als 2 mg pro Kubikzentimeter Ringerlösung gaben andere Werte, weil dann die Eisenkonzentrationen zu niedrig wurden, doch kamen solche Zuckermengen bei meinen Versuchen nicht vor.

Tabelle III.

Tumor. 37,5°. Gasraum 5 Proz. CO_2 in N_2.

Gewicht des Tumorschnitts mg	Versuchszeit Min.	Kohlensäure, beim Schütteln entwickelt cmm	Zuckerverbrauch, aus der Kohlensäureentwicklung berechnet mg	Zuckerverbrauch, nach *Hagedorn-Jensen* gefunden mg
4,49	90	208	0,84	0,85
3,79	109	215	0,86	0,86

Tabelle IV.

Netzhaut. 37,5°. Gasraum 5 Proz. CO_2 in N_2.

Gewicht der Netzhäute mg	Versuchszeit Min.	Verbrauchtes Bicarbonat in cmm CO_2	Zuckerverbrauch, aus dem Bicarbonatverbrauch berechnet mg	Zuckerverbrauch, nach *Hagedorn-Jensen* gefunden mg
3,24 (2 Netzhäute)	90	291	1,17	1,18
4,92 (3 Netzhäute)	60	293	1,17	1,22

II. Messung der Glykolyse durch Bicarbonatbestimmungen.

Nach dem vorhergehenden Abschnitt kann die Glykolyse durch drei Bicarbonatbestimmungen gemessen werden, ein Verfahren, das für anaerobe Bedingungen keine Vorteile bietet, für aerobe Bedingungen jedoch das sicherste ist, über das wir verfügen.

Unter aeroben Bedingungen ergibt weder der Zuckerverbrauch noch die beim Schütteln beobachtete Druckänderung *H* die Glykolyse.

wenn man die Größe der Atmung und den respiratorischen Quotienten nicht kennt. Nun ist es zwar leicht, nach der Druckmethode den Sauerstoffverbrauch der Atmung zu messen, für glykolysierende Zellen aber schwierig, außerdem noch den respiratorischen Quotienten zu bestimmen. Deshalb empfehlen wir zur Messung der aeroben Glykolyse, insbesondere wenn die Atmung gegenüber der Glykolyse in Betracht kommt, die im vorigen Abschnitt geschilderte Anordnung, mit dem Unterschied, daß man in den Gasraum 5 Proz. Kohlensäure in Sauerstoff einfüllt. Man berücksichtigt dann den beim Schütteln erscheinenden Druck H nicht, sondern übersättigt zu den Zeiten t^0 und t' mit Citronensäure und mißt die entwickelte Kohlensäure. Die Differenz, korrigiert für gleiche Schnittgewichte, ergibt die durch Milchsäure ausgetriebene Kohlensäure:

$$x_{CO_2} = B_3^0 - B_3.$$

III. Manometrische Messung der Glykolyse bei Gegenwart von Serum.

Schüttelt man glykolysierende Gewebe in Serum statt in Ringerlösung, so setzt sich die entstehende Milchsäure zum Teil mit dem Bicarbonat des Serums unter Entwicklung von Kohlensäure um, zum Teil mit dem Alkaliproteinat unter Bildung freier Proteine. Es erscheint also nicht eine der Milchsäure äquivalente Menge an freier Kohlensäure, sondern weniger.

Will man unter diesen Umständen die Glykolyse aus der entwickelten Kohlensäure berechnen, so muß die Verteilung der Milchsäure zwischen Alkalibicarbonat und Alkaliproteinat ermittelt werden. Dies geschieht, indem man — genau unter den Bedingungen des Glykolyseversuchs — in das Versuchsserum eine bekannte Menge Milchsäure einträgt und den Druck der entwickelten Kohlensäure mißt[1]. Dabei müssen die eingetragenen Milchsäuremengen so bemessen werden, daß etwa ebensoviel Kohlensäure erscheint wie bei dem Versuch mit dem Gewebe.

Die Ausführung einer derartigen Messung gestaltet sich folgendermaßen:

In ein Gefäß von der Form der Abb. 1 bringt man 1 ccm Serum und einen Gewebeschnitt, füllt den Gasraum mit 5 Proz. Kohlensäure in Stickstoff und schüttelt so schnell, daß Gas- und Flüssigkeitsphase zu jeder Zeit praktisch im Absorptionsgleichgewicht sind. In der Zeit t betrage die Druckzunahme infolge der Kohlensäureentwicklung H mm.

---

[1]) Hierbei wird vorausgesetzt, daß das Volumen der zugeführten Milchsäurelösung gegen das Volumen des Serums klein ist. Ist das nicht der Fall, so muß das Versuchsserum mit Kochsalzlösung in entsprechendem Maße verdünnt werden.

Nunmehr bereitet man zwei Gefäße der gleichen Form und Abmessungen vor, gibt in den Hauptraum R je 1 ccm desselben Serums, in den Anhang A verschiedene Mengen Milchsäure, sättigt mit 5 Proz. Kohlensäure in Stickstoff, kippt, nachdem Druck und Temperatur ausgeglichen sind, die Milchsäure aus A in R ein und spült den Anhang A mehrmals durch Neigen des Gefäßes mit dem Serum aus. In dem einen Gefäß betrage die Zunahme des Kohlensäuredrucks h_1, in dem anderen Gefäß h_2 mm. h_1 sei kleiner als H, h_2 größer als H.

Ist allgemein h die Zunahme des Kohlensäuredrucks beim Eintragen der Milchsäure in Serum, h_0 die Zunahme des Kohlensäuredrucks beim Eintragen der Milchsäure in Ringerlösung, so bilden wir die Quotienten h_0/h und finden (Tabelle V), daß sie für kleine Milchsäuremengen fast unabhängig von der Menge der eingetragenen Milchsäure ist. Multiplizieren wir das Mittel der h_0/h-Werte mit H, der von dem Gewebe hervorgebrachten Zunahme des Kohlensäuredrucks, so erhalten wir die Kohlensäure, die der entwickelten Milchsäure äquivalent ist, nach der Gleichung:

$$x_{CO_2} = \frac{h_0}{h} \cdot H \cdot K_{CO_2},$$

worin also h_0/h den Faktor bedeutet, durch den die Säurebindung des Alkaliproteinats eliminiert wird.

Tabelle V.

37.5°. Je 1 ccm Rattenserum. Gasraum 5 Proz. CO_2 in N_2.

Nr.	Bicarbonatgehalt des Serums Mole pro ccm	Eingetragene Milchsäure Mole pro ccm	v_F ccm	v_G ccm	K_{CO_2}	Druckzunahme für Serum gefunden (h_n) mm	Druckzunahme für Ringerlösung ber. (h_0) mm	$\frac{h_0}{h_n}$
1	2,5 . 10−5	0,88 . 10−5	1,2	19,3	1,76	94	112	1,19
		0,44 . 10−5	1,1	19,9	1,81	45,5	54,5	1,20
2	2,4 . 10−5	0,88 . 10−5	1,2	19,3	1,76	95	112	1,18
		0,44 . 10−5	1,1	19,9	1,81	48	54,5	1,14
3	nicht bestimmt	1,17 . 10−5	1,3	19,2	1,75	124	150	1,21
		0,59 . 10−5	1,3	19,7	1,80	59	73	1,24

Natürlich hängt der Wert des Faktors h_0/h von dem Eiweiß- und Bicarbonatgehalt und von dem p_H der verschiedenen Seren ab und muß für jeden Fall besonders ermittelt werden.

In Tabelle VI sind zwei Beispiele für die Messung der *anaeroben* Glykolyse in Serum angeführt, wobei ich als Versuchsmaterial das *Flexner-Jobling*sche Rattencarcinom und das *Jensen*sche Rattensarkom benutzte. Die Tabelle lehrt, daß die anaerobe Glykolyse beider Tumoren in Rattenserum etwa ebenso groß ist wie in Ringerlösung.

Tabelle VI.

37,5°. Gasraum 5 Proz. CO_2 in N_2.

Tumor	Serum	Schnittgewicht mg	v_F cmm	v_G ccm	K_{CO_2}	Versuchszeit Min.	H mm	$\frac{h_0}{h}$	$Q_{CO_2}^{N_2}$ in Serum	$Q_{CO_2}^{N_2}$ in Ringer nach früheren Versuchen
*Flexner-Jobling*sches Rattencarcinom	Ratte	1,19	1,0	12,5	1,16	135	+ 57,5	1,20	30	Mittel *) 31
*Jensen*sches Rattensarkom	Ratte	2,11	1,0	12,5	1,16	70	+ 65,5	1,16	36	Mittel **) 35

*) Nach dieser Zeitschr. **152**, 309, 1924. — **) Nach unveröffentlichten Versuchen von Dr. *Okamoto*.

In ähnlicher Weise kann die aerobe Glykolyse in Serum manometrisch gemessen werden. Doch muß man bedenken, daß in Sauerstoff die auftretende Druckänderung H — wegen der Atmung — keine Bedeutung hat, die durch Milchsäure ausgetriebene Kohlensäure vielmehr durch Bicarbonatbestimmungen nach Abschnitt I ermittelt werden muß. Die entwickelte Milchsäuremenge ist dann nicht äquivalent der Kohlensäuremenge

$$x_{CO_2} = B_3^0 - B_3,$$

sondern der größeren Kohlensäuremenge

$$x_{CO_2} = \frac{h_0}{h}(B_3^0 - B_3).$$

Nach dieser Gleichung kann die aerobe Glykolyse in Serum berechnet werden, ohne Kenntnis des respiratorischen Quotienten und ohne Kenntnis der Atmung.

IV. Glykolytische Wirkung von Tumorgewebe in Serum.

Die wichtige Frage, ob Tumorgewebe in Serum, ebenso wie Ringerlösung, glykolysiert, habe ich nicht nur manometrisch, sondern zur Kontrolle auch durch Zuckerbestimmungen geprüft.

Die anaerobe Glykolyse ergibt sich direkt aus dem anaerob gefundenen Zuckerverbrauch, die aerobe Glykolyse ist gleich

Gesamtzuckerverbrauch in Sauerstoff minus Zuckerverbrauch in der Atmung.

Als Versuchsmaterial benutzte ich das *Flexner-Jobling*sche Rattencarcinom und das *Jensen*sche Rattensarkom[1]), Gewebe, deren Atmung uns bekannt war und deren Atmung klein ist gegenüber der Glykolyse. Den Zuckerverbrauch in der Atmung berechnete ich

[1]) Den Stamm verdanken wir Herrn Dr. *W. Cramer* in London, dem wir auch hier unseren herzlichen Dank aussprechen.

unter der Annahme, daß *nur* Zucker verbrennt, setzte ihn also gleich $^1/_6$ Mol Zucker pro Mol verbrauchten Sauerstoffs und erhielt so den Minimalwert der aeroben Glykolyse in Serum.

Zur Ausführung der Versuche benutzte ich Gefäße von der Form der Abb. 1, in die ich je *einen* Schnitt und 1 ccm Serum brachte, füllte in den Gasraum 5 Proz. Kohlensäure in Stickstoff oder 5 Proz. Kohlensäure in Sauerstoff und bestimmte bei 37,5° den Zuckergehalt des Serums vor und nach dem Versuch nach *Hagedorn-Jensen*[1]). Es sei bemerkt, daß das Tumorgewebe bei diesen Versuchen mit Ringerlösung nicht in Berührung kam. Ich schnitt den Tumor mit einem in Serum befeuchteten Messer und spülte die Schnitte mit körperwarmem Serum ab.

Tabelle VII enthält je zwei Versuche für das Carcinom und zwei Versuche für das Sarkom. Das Carcinom verbrauchte pro Stunde anaerob 11 Proz., aerob 10 Proz. seines Gewichts an Zucker, das Sarkom anaerob 16 Proz., aerob 12 Proz. Korrigieren wir die aeroben Werte für den Zuckerverbrauch in der Atmung (Q_{O_2} für das Carcinom -7, für das Sarkom -10), so erhalten wir als Minimalwerte der aeroben Glykolyse für das Carcinom 9 Proz. und für das Sarkom 10 Proz. Sowohl diese wie die anaeroben Werte stimmen so gut zu den in Ringerlösung gefundenen[2]), daß wir die Glykolyse in Serum und Ringerlösung praktisch gleich setzen können.

Tabelle VII.

37,5°. Für jeden Versuch 1 ccm Rattenserum. $C_{NaHCO_3} = 2{,}5 \cdot 10^{-2}$ molar.

Tumor	Gasraum	Schnittgewicht mg	Versuchszeit Min.	Zuckermenge in 1 ccm Serum vorher mg	Zuckermenge in 1 ccm Serum nachh. mg	Zuckerverbrauch in der Versuchszeit mg	mg Zucker / mg Gewebe . Std.	Wert d. aeroben Glykolyse, korr. für den Zuckerverbrauch der Atmung
Flexner-Joblingsches Rattencarcinom	5 Proz. CO_2-O_2	1,59	155	2,26	1,84	0,42	0,10	0,09
	5 „ CO_2-N_2	1,19	153	2,26	1,92	0,34	0,11	
Jensensches Rattensarkom	5 „ CO_2-O_2	2,32	90	2,17	1,77	0,40	0,12	0,10
	5 „ CO_2-N_2	2,11	88	2,17	1,69	0,48	0,16	

V. Die Glykolyse im Blut.

Trotz der zahlreichen vorliegenden Untersuchungen über die Glykolyse im Blute ist unbekannt, ob sich die aerobe von der anaeroben Glykolyse unterscheidet, wie in den übrigen von uns untersuchten Fällen[2]) von Glykolyse.

[1]) Vgl. Abschnitt I.
[2]) Diese Zeitschr. 152, 309, 1924.

Um diese Frage zu entscheiden, war es nicht notwendig, das Blut von Sauerstoff zu befreien — was sehr schwierig gewesen wäre —, sondern es genügte, die Atmung der Blutzellen durch Blausäure zu hemmen. Da kleine Konzentrationen an Blausäure die Atmung hemmen, nicht aber die Glykolyse, so haben wir in blausäurehaltigem, mit Sauerstoff gesättigtem Blute die Bedingungen der Anaerobiose.

Es zeigte sich, daß bei Zugabe von Blausäure zu Kaninchenblut die Glykolyse stieg, und bilden wir, wie früher, auch für diesen Fall den Meyerhofquotienten[1])

$$\frac{\text{anaerobe Glykolyse} - \text{aerobe Glykolyse}}{\text{Atmung}}$$

so erhalten wir Werte, die zwischen 1 und 2 liegen. Dies sind die Werte, die *Meyerhof* für den Muskel und wir für Tumoren und Embryonen fanden. Ein Molekül veratmeten Sauerstoffs bringt ein bis zwei Moleküle Milchsäure zum Verschwinden. Die eigentümliche Wirkung der Atmung auf die Spaltungen erfolgt also auch in den kernlosen Blutscheiben.

Hiernach zeigen die kernlosen Blutzellen aerobe Glykolyse, weil ihre Atmung zu klein ist im Vergleich zu ihrer anaeroben Glykolyse. Die Atmung genügt nicht, um die Spaltungen zum Verschwinden zu bringen. Ist dies wahr, so ist zu erwarten, daß stark atmende rote Blutzellen keine aerobe Glykolyse zeigen.

Stark atmende rote Blutzellen sind die kernhaltigen Blutzellen der Vögel[2]). Ich habe sowohl das Blut normaler Gänse, als auch das stärker atmende Blut anämischer Gänse untersucht. In der Tat scheint es, daß hier die aerobe Glykolyse Null ist, während anaerob Zucker gespalten wird. Die Atmung der kernhaltigen Blutzellen reicht aus, um die Glykolyse zum Verschwinden zu bringen, oder ist sogar — wie im anämischen Blute — groß gegen die anaerobe Glykolyse.

Die roten Blutzellen verhalten sich also ganz so, wie es nach den Erfahrungen an Geweben zu erwarten war. Hervorheben wollen wir noch, daß die absoluten Werte der Glykolyse im Blute klein sind (60- bis 100mal kleiner als in Tumoren) und daß die anaerobe Glykolyse in den kern*haltigen* Blutzellen von derselben Größenordnung ist wie in den kern*losen* Blutzellen.

Anordnung der Versuche.

Unsere Aufgabe war, in ein und derselben Blutprobe die Glykolyse und die Atmung zu messen. Ich benutzte defibriniertes Blut, sättigte mit 5 Proz. Kohlensäure in Sauerstoff, fügte zu einem Teile so viel

[1]) Diese Zeitschr. **152**, 309, 1924.
[2]) *O. Warburg*, Hoppe-Seylers Zeitschr. f. Physiol. **59**, 112, 1909.

Blausäure hinzu, daß ihre Konzentration n/1000 war, und bestimmte in beiden Teilen die Atmung in früher beschriebener Weise[1]) den Zuckerverbrauch[2]) nach *Hagedorn-Jensen.* Für jede Einzelmessung genügte 1 ccm Blut. Im ganzen brauchte ich für einen Versuch 6 ccm Blut (Sauerstoffbindung vorher und nachher *ohne* Blausäure, Zuckergehalt vorher und nachher *ohne* Blausäure und *mit* Blausäure). Zur Zuckerbestimmung ist dem oben Gesagten hinzuzufügen, daß 1 ccm Blut vor der Enteiweißung mit 4 ccm Wasser lackfarben gemacht wurde.

Um den Sauerstoff- und Zuckerverbrauch auf die Gewichtseinheit trockener Zellsubstanz reduzieren zu können, ermittelte ich das Zellvolumen in 1 ccm Blut, indem ich bis zur Konstanz des Sedimentvolumens in graduierten Röhrchen zentrifugierte und das Sedimentvolumen durch 5 dividierte.

Die anaerobe Glykolyse ergab sich dann aus dem Zuckerverbrauch der Versuchszeit und der Zellmenge. Was die aerobe Glykolyse anbetrifft, so mußte der Zuckerverbrauch in der Atmung berücksichtigt werden. Dies geschah, indem ich den Sauerstoffverbrauch auf Zuckerverbrennung umrechnete (1 Mol Sauerstoff = $^1/_6$ Mol Zucker) und den so berechneten Zuckerverbrauch mit dem nach *Hagedorn-Jensen* gefundenen verglich. War der aerob gefundene Zuckerverbrauch ebenso groß wie der aus der Atmung berechnete, so setzte ich die aerobe Glykolyse gleich Null (normales Gänseblut). War der aerob gefundene Zuckerverbrauch, wie in anämischem Gänseblut, *kleiner* als der aus der Atmung berechnete, so setzte ich die aerobe Glykolyse a fortiori gleich Null, ein Verfahren, gegen das gewisse Einwände gemacht werden können. Im Kaninchenblut war der aerob gefundene Zuckerverbrauch immer *größer* als der aus der Atmung berechnete, und zwar etwa zehnmal so groß, so daß sich hier die beim Gänseblut erwähnte Unsicherheit nur in einem Korrektionsglied geltend macht.

In Tabelle VIII habe ich die Ergebnisse meiner Messungen zusammengestellt. Die p_H-Werte der Tabelle sind aus dem Bicarbonatgehalt des Serums und dem Kohlensäuredruck nach der Gleichung von *Henderson-Hasselbalch*

$$p_H = 6{,}14 + \log\left[\frac{NaHCO_3}{CO_2}\right]$$

berechnet.

Schließlich füge ich noch zwei Protokolle bei, die alle experimentellen Einzelheiten bezüglich der Blutversuche enthalten.

---

[1]) *O. Warburg,* Zeitschr. f. Physiol. **69**, besonders S. 457, 1910.

[2]) Auch hier könnte man den glykolytischen Zuckerverbrauch durch die Abnahme des Bicarbonatgehalts messen. Ich habe das nicht getan, weil mir die Bestimmung des Korrektionsfaktors h_0/h für eine Suspension von Blutzellen unsicher erscheint.

Tabelle VIII.

37,5°. Gasraum 5 Proz. CO_2 in O_2.

Blut	p_H nach *Henderson-Hasselbalch*	O_2-Verbrauch in 1 ccm Blut pro Std. cmm O_2	Aus der Atmung berechneter Zuckerverbrauch mg Zucker	Nach *Hagedorn-Jensen* gemessener Zuckerverbrauch in 1 ccm Blut pro Std. mg Zucker	Zuckerverbrauch durch Glykolyse in 1 ccm Blut pro Std. mg Zucker	Zellen in 1 ccm Blut cmm	Glykolyse mg Zucker / mg Gewebe . Std.	Atmung Q_{O_2}	Aerobe Glykolyse $Q^{O_2}_{CO_2}$	Anaerobe Glykolyse $Q^{N_2}_{CO_2}$	*Meyerhof*-Quotient
Gans, normal	7,42	45	0,06	aerob 0,06 anaerob 0,13	0 0,13	390	aerob 0 anaerob 0,0017	0,58	0	0,41	
Dieselbe Gans, vier Tage vorher 100 ccm Blut entnommen	7,48	90	0,12	aerob 0,03 anaerob 0,17	0 0,17	320	aerob 0 anaerob 0,0026	1,40	0	0,65	
Dieselbe Gans, drei Tage vorher 100 ccm Blut entnommen	7,46	72	0,10	aerob 0,04 anaerob 0,10	0 0,10	220	aerob 0 anaerob 0,0023	1,65	0	0,56	
Dieselbe Gans, vier Tage vorher 50 ccm Blut entnommen	7,46	75	0,10	aerob 0,03 anaerob 0,12	0 0,12	300	aerob 0 anaerob 0,0020	1,25	0	0,51	
Kaninchen, normal	7,02	7,7	0,01	aerob 0,11 anaerob 0,15	0,10 0,15	450	aerob 0,0011 anaerob 0,0017	0,086	0,28	0,42	1,6
Kaninchen, normal	7,05	8	0,01	aerob 0,11 anaerob 0,14	0,10 0,14	390	aerob 0,0013 anaerob 0,0018	0,103	0,32	0,44	1,2

Protokoll 1.

Gänseblut, anämisch. 1 ccm Blut enthält 220 cmm Zellen.

Bicarbonatbestimmung: (siehe Abb. 1) in R 1 ccm Serum; in A 0,2 ccm 4proz. Citronensäure. Gasraum: 5 Proz. CO_2 in N_2. $T = 37{,}5^0$. $v_F = 1{,}2$. $v_G = 20{,}1$. $K_{CO_2} = 1{,}83$. Beim Umkippen werden 277 mm, das sind 509 cmm CO_2 entwickelt. Das Serum enthält also pro Kubikzentimeter 0,0227 Millimole $NaHCO_3$ oder ist in bezug auf $NaHCO_3$ = 0,0227 molar.

Atmungsmessung: $v_F = 2{,}5$. $v_G = 18{,}0$. $K_{O_2} = 1{,}69$. $T = 20^0$. Gasraum: Luft. Sauerstoffaufnahme von 1 ccm Blut zur Zeit $t = 0'$ 6,5 mm. Sauerstoffaufnahme von 1 ccm Blut zur Zeit $t = 60'$ 49,0 mm. Differenz: 42,5 mm = 72 cmm O_2.

1 ccm Blut hatte in 60 Minuten bei 37,5° 72 cmm O_2 veratmet, das entspricht 0,10 mg Glucose.

$$Q_{O_2} = -1{,}65.$$

Messung des Zuckerverbrauchs: Etwa 5 ccm Blut wurden — bei 37,5° in Röhrchen von 12 ccm Inhalt — mit 4,7 Proz. CO_2 in O_2 bewegt. Für anaerobe Bedingungen ebenso mit 10^{-3} mol. KCN.

Zuckerbestimmung in 1 ccm Blut.

Bedingungen	Zeit Min.	Verbrauch von m/100 $K_3Fe(CN)_6$ ccm	Glucose mg
Aerob	0	5,44	1,90
„	177	5,12	1,79
„	346	4,93	1,72
Anaerob	0	5,59	1,95
„	169	4,77	1,67
„	339	3,94	1,38

Zuckerverbrauch in 1 ccm Blut.

Bedingungen	Zeit Min.	Zuckerverbrauch mg	Zuckerverbrauch pro Std. mg	Q_{CO_2}
Aerob . . .	177	0,12	0,04	—
„ . . .	346	0,18	0,03	—
Anaerob . .	169	0,28	0,10	0,56
„ . .	339	0,57	0,10	0,57

Protokoll 2.

Kaninchenblut, normal. 1 ccm Blut enthält 390 cmm Zellen.

Bicarbonatbestimmung: (siehe Abb. 1) in R 1 ccm Serum, in A 0,2 ccm 4proz. Citronensäure. Gasraum: 5 Proz. CO_2 in N_2. $T = 37{,}5^0$. $v_F = 1{,}2$. $v_G = 20{,}1$. $K_{CO_2} = 1{,}83$. Beim Umkippen werden 110 mm, das sind 201 cmm CO_2 entwickelt. Das Serum enthält also pro Kubikzentimeter 0,009 Millimole $NaHCO_3$ oder ist in bezug auf $NaHCO_3$ = 0,009 molar.

Atmungsmessung: $v_F = 2{,}5$. $v_G = 18{,}0$. $K_{O_2} = 1{,}69$. $T = 20^0$. Gasraum: Luft. Sauerstoffaufnahme von 1 ccm Blut zur Zeit $t = 0'$ 7,0 mm. Sauerstoffaufnahme von 1 ccm Blut zur Zeit $t = 74'$ 13,0 mm. Differenz: 6 mm = 10 cmm O_2.

1 ccm Blut hatte in 60 Minuten bei 37,5° 8 ccm O_2 veratmet, das entspricht 0,01 mg Glucose.

$$Q_{O_2} = -0{,}10.$$

Messung des Zuckerverbrauchs: Etwa 5 ccm Blut wurden — bei 37,5° in Röhrchen von 12 ccm Inhalt — mit 4,7 Proz. CO_2 in O_2 bewegt. Für anaerobe Bedingungen ebenso mit 10^{-3} mol. KCN.

Zuckerbestimmung in 1 ccm Blut.

Bedingungen	Zeit Min.	Verbrauch von m/100 $K_3Fe(CN)_6$ ccm	Glucose mg
Aerob	0	4,71	1,65
"	180	3,77	1,32
"	384	2,77	0,97
Anaerob	0	4,78	1,67
"	172	3,65	1,27
"	376	2,57	0,90

Zuckerverbrauch in 1 ccm Blut.

Bedingungen	Zeit Min.	Zuckerverbrauch mg	Zuckerverbrauch pro Std. mg	Q_{CO_2}
Aerob . . .	180	0,33	0,11	—
" . . .	384	0,68	0,11	—
Anaerob . .	172	0,40	0,14	0,44
" . .	376	0,77	0,12	0,36

Neue Beiträge zur Insulinwirkung auf die Blutmilchsäure.

Von

J. A. Collazo (Montevideo, S.-A.) und **J. Lewicki** (Warschau).

(Aus der I. medizinischen Klinik in Wien.)

(Eingegangen am 5. März 1925.)

Bei der Erforschung des Wirkungsmechanismus des Insulins ist es geboten, dem Verhalten des *intermediären* Kohlehydratstoffwechsels besondere Aufmerksamkeit zu schenken. Die Untersuchungen, die uns in der Bearbeitung der Insulinfrage seit längerer Zeit beschäftigen, führten uns zu einem der wichtigsten Produkte des intermediären Kohlehydratumsatzes der Milchsäure. Wir setzen die wichtigsten Tatsachen aus der Physiologie der Milchsäure als bekannt voraus. Es sei bloß bemerkt, daß die Milchsäure im Kohlehydratumsatz der Muskulatur eine eminent wichtige Rolle spielt, daß sie sich *im arbeitenden, ruhenden* und *absterbenden Muskel* in beträchtlichen Mengen findet. Es darf auch die Rolle der Milchsäure im Fett- und Aminosäurenstoffwechsel nicht übersehen werden. Man kann die Milchsäure als eines der *Bindeglieder* zwischen den verschiedenen Gebieten des Gesamtumsatzes betrachten [s. auch *Collazo* und *Lewicki*[1])].

Die aus der Wichtigkeit der Milchsäure resultierende Notwendigkeit, bei den Insulinforschungen auch die Wirkung auf die Milchsäure zu untersuchen, wurde bereits von verschiedenen Autoren gebührend berücksichtigt, und zwar haben *Collazo, Händel* und *Rubino*[2]) bei *reichlich mit Kohlehydraten gefütterten* Meerschweinchen im Muskelbrei in vitro nach Insulin eine beträchtliche *Milchsäurevermehrung* festgestellt. *Baur* und *Kuhn*[3]) haben nach Insulin in vivo in den Muskeln des *nüchternen Tieres* eine *Verminderung* der Milchsäure bis auf 76 Proz. festgestellt. *Briggs* und Mitarbeiter[4]) haben in der Mehrzahl der an-

---

[1]) *Collazo* und *Lewicki*, Deutsch. med. Wochenschr. Nr. 15, 1925.

[2]) *Collazo, Händel* und *Rubino*, Klin. Wochenschr. 8, 1924; Deutsch. med. Wochenschr. **23**, 1924.

[3]) *Baur* und *Kuhn*, Münch. med. Wochenschr. **17**, **1924**.

[4]) *Briggs, Koechig, Doisy* und *Weber*, Journ. of biol. Chem. 58, 1924.

gestellten Versuche mit *Hunden im Blute* derselben eine *Vermehrung* der Milchsäure gefunden. Diese Untersuchungen wurden nach der *Clausen*schen Methode bei Hunden, denen durch *2 Tage* jede Nahrung entzogen wurde, angestellt. Die Vermehrung der Milchsäure erklären die Autoren durch eine *spezifische Wirkung* des Insulins, welche die Bildung der Milchsäure aus dem Blutzucker hervorruft, und lehnen deshalb die gesteigerte Muskeltätigkeit und Anoxämie als Ursache entschieden ab. Die großen, von den Autoren gefundenen Schwankungen in den Werten der Milchsäure beeinträchtigen die Eindeutigkeit und Sicherheit der Ergebnisse. *Tolstoi* und *Mitarbeiter*[1]) haben unter vier Diabetesfällen nach Insulin zweimal eine Milchsäuresenkung und zweimal eine Steigerung derselben festgestellt. In diesen zwei letzten Fällen war der Blutzucker unter 0,1 Proz. gesunken. Die Autoren glauben, entgegen *Briggs* und *Mitarbeitern*, daß die Milchsäure im Blute sich nicht quantitativ zur Blutzuckersenkung verhält. *Collazo* und *Lewicki* haben in Versuchen mit Insulin an Diabetikern und gesunden Menschen gefunden:

1. In der Mehrzahl der Fälle eine *Senkung* der Blutmilchsäure im *nüchternen* Zustande; in anderen Fällen keine Veränderung oder eine kleine Vermehrung.

2. *Bei gleichzeitiger Gabe von Zucker* hingegen eine starke regelmäßige *Vermehrung* der Blutmilchsäure. *Isaac* und *Adler*[2]) stellen bei Menschen nach Dioxyaceton + Insulin eine deutliche Blutmilchsäuresteigerung fest.

Einer von uns (*Collazo*) mit *Supniewski*[3]) stellte an einer großen Zahl von *Kaninchen im nüchternen* Zustande eine *Verminderung* der Blutmilchsäure innerhalb von $1\frac{1}{2}$ Stunden nach Insulin fest. *Baur* und *Kuhn*[4]) berichten in vorläufiger Mitteilung von einer *Ziege*, welche nach etwa 72 Stunden Hunger und einer starken Insulindosis nach einer kurz andauernden Vorphase des Milchsäureabfalls eine *Milchsäuresteigerung* (30 bis 300 Proz.) zeigte. Dann kommt eine zweite Phase (5 bis 7 Stunden) der hypoglykämischen Krämpfe, wo die Milchsäure sinkt.

Aus diesen kurzen Bemerkungen geht schon hervor, *daß bisher eine Einigkeit über die Wirkung des Insulins auf die Milchsäure noch nicht erzielt wurde*, wir sahen uns deshalb veranlaßt, die Untersuchungen über diese Frage fortzusetzen. Unsere früheren Versuche bezogen sich auf Menschen und Kaninchen, die Versuche, über die wir in der vor-

---

[1]) *Tolstoi*, *Lebel*, *Levine* und *Richardson*, Proc. of the soc. of exper. biol. and med. **21**, 8, 449, 1924.

[2]) *Isaac* und *Adler*, Klin. Wochenschr. **27**, 1924.

[3]) *Collazo* und *Supniewski*, diese Zeitschr. **154**, 423, 1924.

[4]) *Baur* und *Kuhn*, Klin. Wochenschr. **49**, 1924.

liegenden Arbeit berichten wollen, wurden an *Hunden* ausgeführt. Die Tiere *hungerten 24 Stunden* und wurden in voller Ruhe gehalten. Das Insulin wurde intravenös eingespritzt. Das verwendete Präparat war das Insulin „Chemosan" (Wien). Wir berechneten drei klinische Einheiten = eine Kanincheneinheit. Die Resultate sind in Grammprozenten angegeben. Wir lassen unsere Versuchsprotokolle folgen.

Versuch 1.

2. Dezember 1924. Hund Nr. 1. 10 kg Gewicht. Nach 24 Stunden Hunger wurden 21 klinische Einheiten = 7 Kanincheneinheiten Insulin in die Ohrvene eingespritzt, d. h. eine Kanincheneinheit auf 1428 g Gewicht. Die Blutentnahme erfolgte durch einen scharfen Schnitt in die Vene des zweiten Ohres, und zwar 6 ccm vor und nach der Einspritzung.

	Vor der Injektion	1 Std. 20 Min.	2 Std. 30 Min.	27 Std.
		nach der Injektion		
Blutzucker	0,110	0,020	0,030	0,095
Blutmilchsäure . . .	0,0134	0,0268	0,0268	0,0177

Bemerkungen: ¼ Stunde nach der intravenösen Injektion trat die klinische Wirkung des Insulins ein. Das Tier fühlte sich sichtlich schlecht, es hielt sich nicht mehr aufrecht und nahm eine schlafsuchtähnliche Haltung ein. Die Atmung war bald sehr tief und später stoßweise und mehr beschleunigt. 1 Stunde 20 Minuten nach der Injektion stellten wir 100 Atemzüge in der Minute fest. Der Zustand des Tieres war apathisch. Lediglich auf Anruf hob es den Kopf und konnte nur mit Hilfe der Führung an der Leine einige unkoordinierte Schritte machen. Nach 2 Stunden 30 Minuten zählten wir 54 Atemzüge und war der Allgemeinzustand des Hundes bedeutend besser. Wir konnten bei unseren Versuchen keine Krämpfe beobachten, die bei Kaninchenversuchen fast regelmäßig eintreten. Nur einmal hat sich der Hund gestreckt.

Versuch 2.

4. Dezember 1924. Hund Nr. 2. 12 kg Gewicht. Nach 24 Stunden Hunger wurden 21 klinische Einheiten = 7 Kanincheneinheiten Insulin in die Ohrvene eingespritzt, d. h. 1 Kanincheneinheit auf 1714 g. Die Blutentnahme erfolgte wie beim Tier Nr. 1.

	Vor der Injektion	1½ Std.	2½ Std.	6 Std.
		nach der Injektion		
Blutzucker	0,080	0,025	0,060	0,060
Blutmilchsäure . . .	0,0196	0,0209	0,0349	0,0235

Bemerkungen: Allgemeinzustand wie vorhin beschrieben trat 20 Minuten nach der Injektion ein. Die Atmungszahl war vor dem Versuch 30, nach 1½ Stunden 50, nach 2½ Stunden 80 Atemzüge.

Diese beiden Versuche betrachten wir als mit sehr großer Menge Insulin durchgeführt, d. h. viel mehr als eine Kanincheneinheit auf 2 kg Gewicht. Die Tiere reagieren sehr leicht auf die Injektion, wie

man aus dem ganz außerordentlichen Fallen des Blutzuckers bis auf den vierten Teil und noch weniger entnehmen kann. Puls war unregelmäßig und intermittierend Herzschlag, Arrhythmie und Tachykardie.

Versuch 3.

11. Dezember 1924. Hund Nr. 3. 16 kg Gewicht. Versuchsanordnung und Injektion wie in den beiden ersten Fällen, 12 klinische Einheiten = 4 Kanincheneinheiten, d. h. 1 Kanincheneinheit auf 4 kg Gewicht.

	Vor der Injektion	1 Std. 10 Min.	2 Std. 20 Min.	4 Std.	7 Std. 30 Min.
		nach der Injektion			
Blutzucker . .	0,088	0,032	0,060	0,055	0,065
Blutmilchsäure	0,0219	0,0281	0,0178	0,0149	0,0197

Bemerkungen: Der Hund, der während der ganzen Versuchszeit beobachtet wurde, zeigte keinerlei Erscheinungen der klinischen Insulinwirkung. Lediglich zwischen 1 bis 1½ Stunden nach der Injektion erhöhte sich die Atmung bis 40. Leichte Tachykardie zur gleichen Zeit.

Wir machen besonders auf die noch immer große Wirkung der verhältnismäßig kleinen Dosis Insulin auf den Blutzucker aufmerksam und den Gegensatz zur Blutmilchsäure, die nicht so stark gestiegen und sogar *nach 2 Stunden gesunken* war.

Aus unseren Versuchen können wir entnehmen, *daß man eine nennenswerte Steigerung der Blutmilchsäure bei Hunden nur erreichen kann, wenn man bei Hungertieren mit einer großen Dosis Insulin arbeitet.*

Weiter können wir als sehr auffallende Erscheinung feststellen, daß ein Steigen der Blutmilchsäure mit einer *zunehmenden Atemnot* (*Dyspnoe*) *parallel geht.* Diese Atemnot können wir als durch eine *toxische Wirkung des Insulins im Hungertier* hervorgerufen betrachten. Die *äußeren klinischen Erscheinungen* der Hypoglykämie erreichen zur Zeit *der höchsten Atemnot ihren Höhepunkt.* Wir weisen bei dieser Gelegenheit darauf hin, daß wir — im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser drei Versuche — bei normalen Menschen und Kaninchen (l. c.) weder die Atemnot noch ein Steigen der Blutmilchsäure beobachten konnten. Wir legen der Erscheinung der Atemnot bei Hunden sehr *große Bedeutung* bei und weisen darauf hin, daß die Versuche von *Briggs* und *Mitarbeitern* bei Hunden sowie von *Baur* und *Kuhn* bei Ziegen trotz *ungeheuer großer Insulindosen bei ein- bis dreitägigen Hungertieren* dieses Phänomen nicht zeitigten oder daß es nicht beschrieben wurde.

Wir wissen, daß nach Insulin bei Gaswechselversuchen oft eine Verminderung des O_2-Verbrauchs und dadurch eine Steigerung des respiratorischen Quotienten festgestellt wurde, während sich die CO_2-Abgabe verschieden verhält. Als Tatsache kann die Verminderung

des O_2-Verbrauchs und die Verminderung der Wärmeerzeugung mit Temperaturabfall gelten. Oft sinkt auch die CO_2-Ausscheidung in Respirationsversuchen, was alles gegen eine Vermehrung der Kohlehydratverbrennung *im nüchternen Tiere* spricht. Die Ergebnisse dieser Beobachtungen des Gaswechsels *in vivo* während der Insulinwirkung stimmen nicht ganz mit den wiederholten Versuchen von *Neuberg* und *Gottschalk* überein, die eine oxydative Phase festgestellt haben. Nach *Büchner* und *Grafe*[1]) wird doch der Gesamtgaswechsel ebenso wie der respiratorische Quotient isolierter Gewebsschnitte durch Insulin *vermehrt*.

Wir müssen uns jetzt nach der *Bedeutung* des Befundes der Blutmilchsäuresteigerung fragen, eine Erscheinung, die schon *Briggs* und *Mitarbeiter*, *Baur* und *Kuhn* beobachtet haben, wenn sie mit außergewöhnlich starken Mengen Insulin arbeiteten.

Das riesige Anwachsen der Atemnot, bei welchem wir bis zu 100 Atemzügen in der Minute gezählt haben, dürfen wir keineswegs unterschätzen, und es scheint, daß *durch die Atemnot eben eine Vermehrung der Milchsäure zwangsläufig hervorgerufen wird*, was möglicherweise von der physiologischen Wirkung des Insulins *unabhängig* ist.

Durch eine große Menge Insulin wird bei Hunden eine toxische Dyspnoe mit Sauerstoffmangel hervorgerufen. Aus der Physiologie ist bekannt, daß in diesem Zustande der anoxybiotische Kohlehydratspaltungsprozeß überwiegt, d. h. eine Energielieferung ohne Sauerstoffverbrauch durch Milchsäurebildung erfolgt, Arbeit geleistet wird, ohne daß genügend Sauerstoff zur wirklichen Verbrennung zur Verfügung steht. Dieser Zustand tritt nach Insulininjektion ein, wenn die Mengen des verwendeten Insulins außerordentlich große sind.

Bei CO_2-Vergiftungen und überhaupt bei Sauerstoffmangel wurde eine Steigerung der Milchsäure im Blute wiederholt nachgewiesen. [*Hoppe-Seyler* und *Araki*[2]), *Macleod*[3]), *Saito* und *Katsuyama*[4]), *Ten* und *Dornshate*[5]) u. a.]

Wir haben bereits selbst in unserer ersten Arbeit nachgewiesen, daß ein bluthämolytisches Gift (Phenylhydrazin) eine Vermehrung der Milchsäure im Blute bis auf 500 Proz. des normalen Wertes hervorruft. In Bestätigung dieser vorher ausgesprochenen Annahme fanden wir zunächst bei Leberkranken mit Ikterus und Herzkranken mit

---

[1]) *Büchner* und *Grafe*, Klin. Wochenschr. Nr. 51, 1923.
[2]) *Hoppe-Seyler* und *Araki*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **19**, 422; **20**, 365, 1895.
[3]) *Macleod*, Amer. Journ. of Phys. **55**, 149, 1921.
[4]) *Saito* und *Katsuyama*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **82**.
[5]) *Ten* und *Dornshate*, ebendaselbst **54**.

Anoxämie eine Steigerung der Blutmilchsäure, worüber wir näher in einer anderen Arbeit berichten werden.

Bei früheren von uns mit *Supniewski* durchgeführten Versuchen beim Menschen und Kaninchen mit mäßigen Dosen Insulin bei 24stündiger Hungerzeit haben wir *in der Mehrzahl der Fälle eine Senkung der Blutmilchsäure beobachtet* (in der ersten bis dritten Stunde nach der Injektion). Nur im Falle, wo die gegebene Dosis *erhöht* wird, steigt die Milchsäure.

Nachdem die Versuche *beim Hungertier nicht den physiologischen Bedingungen entsprechen,* haben wir, um die Wirkung des Insulins richtig beurteilen zu können, Versuche vorgenommen, bei welchen wir reichlich Zucker vor der Injektion gegeben hatten, und beobachtet, daß in diesen Fällen keinerlei äußere klinische Wirkung des Insulins eintrat, sondern nur die *Milchsäure,* wie unter den früheren Versuchsbedingungen, *gestiegen ist.* Wenn wir also die Versuche beim Menschen und Kaninchen denen am Hunde gegenüberstellen, müssen wir sagen, daß die Wirkung beim Hungertier keineswegs als eine *primäre* des Insulins, sondern *als eine Erscheinung der Dyspnoe bezeichnet werden muß.* Um diese Frage zu entscheiden, haben wir folgenden Versuch unternommen, in welchem die respiratorische Nebenwirkung durch *eine mechanische Regelung der Atmung* ausgeschaltet wird.

Ein Hund von 16 kg Gewicht wird mit Uretan narkotisiert, auf den Operationstisch gebunden, die Trachea freigelegt, durch eine Glaskanüle mit dem *Mayer*schen Atmungsregelungsapparat verbunden, welcher 30 Atemzüge in der Minute gestattet. Der Versuch dauerte insgesamt 5 Stunden. Nach ½ Stunde der mechanisch regulierten Atmung haben wir die *Femoralarterie und Vene* frei präpariert und in jedes Gefäß eine Kanüle mit einem Hahn eingeführt und befestigt, welche ein bequemes Entnehmen des Blutes gestatten, um die Blutmilchsäure und den Blutzucker nach den früher angewendeten Methoden zu messen.

Nach der ersten Blutentnahme haben wir 24 klinische Einheiten = 8 Kanincheneinheiten Insulin in die andere Femoralvene eingespritzt. Nach *jeder halben Stunde* wurde gleichzeitig aus der Arterie und Vene Blut entnommen. Nebenstehend verzeichnen wir die Ergebnisse.

Diese Versuche betrachten wir als Antwort auf unsere Fragestellung und als endgültige Entscheidung, *daß die Milchsäure bei gleichmäßiger Atmung (30 in der Minute) sinkt und nach 4½ Stunden wieder zum normalen Zustand zurückkehrt.* Bei diesen Versuchen, die den physiologischen Bedingungen entsprechen und bei denen die Nebenwirkung der Dyspnoe durch die künstliche Atmungsregelung vermieden wird, konnten wir eine *Übereinstimmung* mit unseren früheren Versuchen mit kleinen Mengen Insulin feststellen, woraus geschlossen

Zeit	Blutzucker			Blutmilchsäure		
	Entnahme aus der		Unterschied	Entnahme aus der		Unterschied
	Arterie	Vene		Arterie	Vene	
Vor Insulin .	0,012	0,010	0,020	0,0431	0,0493	0,0062
Nach $^1/_2$ Std. .	0,085	0,070	0,016	0,0345	0,0438	0,0093
„ 1 „ .	0,060	0,060	0,000 [1]	0,0319	0,0391	0,0088
„ $1^1/_2$ „ .	0,060	0,050	0,010	0,0254	0,0371	0,0117 [1]
„ 2 „ .	0,080	0,065	0,015	0,0276	0,0381	0,0105
„ $2^1/_2$ „ .	0,095	0,078	0,017	0,0279	0,0389	0,0112
„ $3^1/_4$ „ .	0,095	0,070	0,025 [2]	0,0286	0,0347	0,0061
„ 4 „ .	0,110	0,090	0,020	0,0306	0,0327	0,0026 [2]
„ $4^1/_2$ „ .	0,115	0,105	0,010	0,0328	0,0370	0,0042

[1]) Anoxybiotische Phase. [2]) Oxydative Phase.

werden kann, daß die Ergebnisse von *Briggs* und Mitarbeitern, *Baur* und *Kuhn* ebenso wie *unsere ersten drei Versuche nicht auf die Wirkung des Insulins, sondern wenigstens zum Teil auf die Dyspnoe zurückzuführen sind.*

Die Werte des Milchsäuregehalts und des Zuckers in der Arterie und Vene verhalten sich gerade *entgegengesetzt*. In der Vene ist weniger Zucker und mehr Milchsäure, was für einen Zuckerverbrauch durch die Muskeln und gleichzeitige Lieferung von Milchsäure spricht. Die Arterien speisen den Muskel mit Zucker und weisen weniger Milchsäure auf. Den Unterschied des Zuckers und der Milchsäure in den Gefäßen erklären wir wie folgt: *Vor dem Versuch bestand ein Unterschied von 20 mg Zucker, im Höhepunkt der Wirkung des Insulins sinkt dieser Unterschied auf Null und steigt allmählich wieder bis zum normalen Unterschied von 20 mg an. Was die Milchsäure anlangt, so steigt der Unterschied von 6,2 bis 11,7 mg allmählich an und erreicht nach 4 Stunden bei derselben Atmung den Tiefpunkt mit 2,6 mg. Auf Grund dieser Beobachtung kann man eine erste anoxybiotische Phase, der eine oxydative Phase folgt, unterscheiden, während welcher weniger Milchsäure an das Venenblut geliefert wird.*

Diese Versuche lassen mit größerer *Sicherheit* Schlüsse zu, weil sie beweisen, *daß die Bildung der Milchsäure nicht einer entsprechenden quantitativen Blutzuckersenkung entspricht*, wie *Briggs* und Mitarbeiter ausgedrückt haben: „The desappareance of sugar is due to the formation of lactic acid“.

Zusammenfassung.

1. *Das Insulin in großen Mengen bei nüchternen, normalen Tieren angewendet, verursacht durch eine toxische Dyspnoe eine Blutmilchsäuresteigerung, was aber nicht als physiologische Wirkung des Insulins betrachtet werden kann.*

2. Bei mäßigen Dosen Insulin haben wir bei gesunden, normalen und nüchternen Menschen und Tieren (Kaninchen) in der Mehrzahl der Fälle, wie auch beim mit großer Dosis Insulin behandelten Hund, bei dem die Atmung künstlich geregelt wurde, eine Senkung der Milchsäure gesehen.

3. Als physiologische Wirkung des Insulins müssen aber bloß die Versuche mit reichlichen Kohlehydratgaben betrachtet werden. Die gleichzeitige Anwendung von Insulin + Zucker ruft eine regelmäßige Vermehrung der Milchsäure hervor, wie Collazo, Händel und Rubino, Collazo und Lewicki, Collazo und Supniewski wiederholt nachgewiesen haben und als physiologische Phase der Insulinwirkung betrachten.

Studien über intermediären Kohlenhydratumsatz an der Muskulatur unter gleichzeitiger Verfolgung des Gaswechsels (Norm, Hunger, Insulinwirkung). IX.

Von

Theodor Brugsch, Hans Horsters und Joseph Vorschütz.

(Aus der II. medizinischen Klinik der Charité.)

(Eingegangen am 9. März 1925.)

In unserer siebenten Mitteilung[1]) haben wir Gaswechselversuche an Lebern von Meerschweinchen und Hunden unter normalen Ernährungsverhältnissen, im Hunger, bei Insulinwirkung und bei pankreasexstirpierten Tieren angestellt, wobei gleichzeitig die intermediären Verhältnisse des Kohlenhydratumsatzes unter Berücksichtigung der Phosphorsäure erforscht wurden. Wir fügen diesen Versuchen nunmehr ähnlich angelegte Untersuchungen an, die an der Muskulatur durchgeführt wurden, wobei es uns hauptsächlich auf das Studium der Insulinwirkung ankam.

Methodik.

Diese schließt sich völlig an die in der siebenten Mitteilung (s. d.) auseinandergesetzte Methodik an, nur daß statt der Leber die Muskulatur als Versuchsobjekt gewählt wurde in der Weise, daß dem durch Nackenschlag getöteten Tiere Muskulatur entnommen wurde, aus der Rückenmuskulatur und Extremitätenmuskulatur in etwa gleichem Verhältnis. Die mit der Schere entnommene Muskulatur wurde abgewogen und alsdann im Mörser zerstampft und in einer Ringerlösung, die 0,1 Proz. Glucose aber kein $NaHCO_3$ enthielt, im Verhältnis von 1 : 10 suspendiert, wobei die bindegewebigen Bestandteile der emulsionierten Muskulatur durch Mullgaze abfiltriert wurden. Von dieser Emulsion wurden je 30 ccm in zwei genau kalibrierte, mit je zwei Dreiwegshähnen am Glasstopfen versehene, etwa 300 ccm fassende Gefäße gebracht und unter gleichen Bedingungen in einem Schüttelapparat bei 40° C 50 Minuten lang geschüttelt. Das eine Gefäß wurde alsdann auf den O_2- und CO_2-Gehalt der Luft im kalibrierten Kolben mit Hilfe des *Haldane*schen Apparats untersucht, wobei die CO_2, die noch in der Suspension adsorbiert war, mit verdünnter H_2SO_4 ausgetrieben wurde, während der Inhalt des zweiten Gefäßes, der

[1]) Diese Zeitschr. **151**, H. 3/4, 1924.

sich in bezug auf Menge und Luftvolumen gleich wie der des ersten Gefäßes verhielt, auf Zucker (*Folin-Wu*), anorganische Phosphorsäure (*Embden*), Milchsäure (*Clausen-Meyerhof*) untersucht wurde. Vor Anstellung des Durchschüttelungsversuchs wurde ein aliquoter Teil der Organsuspension ebenfalls auf Zucker, anorganische Phosphorsäure und Milchsäure untersucht. Unser methodisches Vorgehen deckt sich mit den Verfahren, wie es in unseren früheren Mitteilungen I, III, V und vor allem VII beschrieben worden ist. Die Berechnung der Werte geschieht auf 10 g des Organs, indessen wurde, um die nachträgliche Möglichkeit zu bieten, eine Berechnung gegebenenfalls auf Trockensubstanz eintreten zu lassen, eine Kjeldahlanalyse der Organsuspension ausgeführt und daraus der Eiweißwert durch Multiplikation mit dem Faktor 6,25 berechnet.

A. Versuche an normal genährten Tieren (Meerschweinchen).

Versuch 1 (Jounal II, 166).

10 g Muskulatur aus den hinteren Extremitäten eines gut genährten Meerschweinchens werden zu 100 ccm Ringerlösung (mit 0,1 Proz. Glucose ohne $NaHCO_3$!) suspendiert, nachdem die Muskulatur sehr fein zerrieben worden ist, wobei die bindegewebigen Teile durch Mullfilter vom Parenchym getrennt wurden. Die Versuche wurden in zwei Portionen von je 30 ccm der Suspension im kalibrierten Gefäß durchgeführt, indem die Suspension 50 Minuten lang bei 40° C geschüttelt wird.

Eiweißgehalt der Suspension = 1,09 Proz.

Berechnung der Werte auf 10 g Muskulatur:

CO_2-Produktion . . . . = 1,49 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 1,60 „
Respirationsquotient . . . . . . = 0,9

O_2-Verbrauch berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,47 ccm.

Auf 10 g Muskulatur berechnet:

	Zuckergehalt berechnet als Glucose mg	Milchsäure mg	Anorganisches H_3PO_4 mg
Vorher	119	8,3	4
Nachher . . .	113	25,7	6,1
Bilanz	— 6	+ 17,4	+ 2,1

Da für jedes Milligramm Glucose bzw. Milchsäure, die verbrennen, 1,467 mg CO_2 frei werden (reduziert auf 0° und 760 mm Hg) bzw. eine gleiche Menge O_2 verbraucht wird, so entspricht jedes Kubikzentimeter CO_2 bzw. O_2 der Verbrennung von 1,3364 mg Glucose bzw. Milchsäure. Zwar ist der respiratorische Quotient nicht völlig 1 (wie er sonst bei der Muskulatur gefunden wird, wie weiter unten aus unseren Versuchen ersichtlich wird), trotzdem können wir den Wert eines O_2-Verbrauchs von 1,60 ccm auf Kohlenhydratverbrennung zurückführen und somit folgende Bilanz aufstellen.

Kohlenhydrat verbrennt (Glucose bzw. Milchsäure) = 1,6 × 1,3364 = 2,14 mg. Verschwunden sind 6 mg Glucose, produziert 17,4 mg Milchsäure, das ergibt eine Bilanz von + 11,4 mg zugunsten von Milchsäure. Es sind also neben einer Verbrennung von 2,14 mg Kohlenhydrat 11,4 mg Milchsäure gebildet worden, die nur aus den Kohlenhydratvorräten des Muskels stammen können, d. h. der Glykogen-, nicht etwa der Hexosediphosphorsäure, da nur ein Zuwachs von 2,1 mg anorganischer H_3PO_4 zu verzeichnen ist, ein Wert, der annähernd 2 mg Zucker, berechnet auf d-Fructosediphosphorsäure, entspricht.

Versuch 2 (Journal II, 167).

10 g Muskulatur aus den hinteren Extremitäten eines gut genährten Meerschweinchens werden zu 100 ccm Ringerlösung (mit 0,1 Proz. Glucose, aber ohne $NaHCO_3$) suspendiert. Je zwei Portionen der Suspension zu je 30 ccm werden in 300-ccm-Gefäßen bei 40° C 50 Minuten lang unter Luft geschüttelt.

Eiweißgehalt der Suspension = 1,19 Proz.

Berechnung der Werte auf 10 g Muskulatur:

CO_2-Produktion . . . . = 1,46 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 1,34 „
Respirationsquotient . . . . . . = 1,08

O_2-Verbrauch berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,13 ccm.

Auf 10 g Muskulatur berechnet:

	Zuckergehalt berechnet als Glucose mg	Milchsäure mg	Anorganisches H_3PO_4 mg
Vorher	131	23	6,7
Nachher . . .	138	37	7,0
Bilanz	+ 7	+ 12	+ 0,3

Da der respiratorische Quotient sich um 1 hält, ist man berechtigt, aus der Größe von 1,46 ccm CO_2 die Verbrennung von 1,46 × 1,3364 = 1,95 mg Kohlenhydrat zu errechnen. Neben diesem Werte verbrannten Kohlenhydrats ergibt die Bilanz die Bildung von 7 mg Glucose und 12 mg Milchsäure, die nicht aus Hexosediphosphorsäure stammen können, sondern aus dem Glykogen des Muskels sich herleiten müssen.

Versuch 3 (Journal II, 178).

10 g Muskulatur werden im Verhältnis 10 : 100 ccm Ringerlösung (ohne $NaHCO_3$-Gehalt und mit 0,1 Proz. Glucose) nach Verreibung aufgeschwemmt. Das Meerschweinchen war gut genährt. Die Versuche wurden in drei Portionen (A, B, C) angestellt, indem jeweils 30 ccm der Suspension 50 Minuten lang bei 40° C im kalibrierten etwa 300-ccm-Gefäß mit Luft geschüttelt wurde. Zu Portion A und B wurden für 100 ccm Suspension zwei Einheiten gut wirksamen Insulins zugesetzt.

Eiweißgehalt der Suspension = 1,03 Proz.

Versuch A (mit Insulinzusatz von 2 Einheiten Insulin in vitro), berechnet auf 10 g Muskulatur:

CO_2-Produktion	= 1,40 ccm
O_2-Verbrauch	= 1,37 „
Respirationsquotient	= 1,02

O_2-Verbrauch berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,33 ccm.

	Zuckergehalt berechnet als Glucose mg	Milchsäure mg	Anorganisches H_3PO_4 mg
Versuch B (mit Insulinzusatz von 2 Einheiten Insulin in vitro), berechnet auf 10 g Muskulatur.			
Vorher	127	31,5	6
Nachher . . .	135	14,5	4
Bilanz	+ 8	— 17,0	— 2
Versuch C (ohne Insulinzusatz in vitro), berechnet auf 10 g Muskulatur.			
Vorher	139	8,3	6
Nachher . . .	133	12,2	6
Bilanz	— 6	+ 3,9	± 0

Da der Respirationsquotient annähernd 1 ist, so ist die Annahme berechtigt, daß der Wert von 1,40 ccm $CO_2 = 1,40 \times 1,3364$ mg veratmeter Glucose bzw. Milchsäure entspricht, das ist *1,87 mg*. Gleichzeitig liegen die intermediären Kohlenhydratverhältnisse (siehe Versuch B) derartig, daß 17 mg Milchsäure verschwinden, daß der Wert an Glucose wächst und 2 mg anorganisches H_3PO_4 in der Bilanz fehlen. *Das weist auf intermediäre Hexosediphosphorsäurebildung unter dem Einfluß von Insulin im Muskel hin.* Die Portion *ohne* Insulinzusatz zeigt dagegen keine Bilanzstörung in der anorganischen H_3PO_4, das Verschwinden von 6 mg Glucose, die Produktion von 3,9 mg Milchsäure. Da anzunehmen ist — obgleich für Portion C kein Atmungsversuch durchgeführt worden ist —, daß der Wert der Atmung annähernd an 2 mg Kohlenhydrat herankommt, so ist die Schlußfolgerung erlaubt, daß hier der Muskel ohne Insulinzusatz nur Glucose gespalten bzw. veratmet hat.

Versuch 4 (Journal II, 180).

10 g Muskulatur eines gut genährten Meerschweinchens werden nach Verreiben suspendiert zu 100 ccm Ringerlösung (ohne $NaHCO_3$, mit 0,1 Proz. Glucose). Die Versuche wurden in drei Portionen (A, B, C) durchgeführt, indem je 30 ccm der Suspension in kalibrierten 300-ccm-Gefäßen bei 40° C 50 Minuten lang mit Luft geschüttelt werden. Zu Portion B sind zugesetzt worden 1 ccm Muskelkochsaft für 30 ccm Suspension (der Muskelkochsaft entspricht der Menge von 1 g Muskulatur).

Eiweißgehalt der Suspension = 1,44 Proz.

Versuch A (*ohne* Zusatz von Muskelkochsaft), berechnet auf 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 1,70 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 1,60 „
Respirationsquotient . . . . = 1,06

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,11 ccm.

Versuch B (mit Zusatz von Muskelkochsaft), berechnet auf 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 1,94 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 2,54 „
Respirationsquotient . . . . = 0,76

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,83 ccm.

	Zuckergehalt berechnet als Glucose mg	Milchsäure mg	Anorganisches H_3PO_4 mg
Versuch B (mit Zusatz von Muskelkochsaft), berechnet auf 10 g Muskulatur.			
Vorher	120	9,2	10
Nachher . . .	119	5,4	7,4
Bilanz	— 1	— 3,8	— 2,6
Versuch C (ohne Zusatz von Muskelkochsaft), berechnet auf 10 g Muskulatur.			
Vorher	120	9,2	10
Nachher . . .	136	16,0	7,3
Bilanz	+ 16	+ 6,8	— 2,7

Im Versuch *ohne* Zusatz von Muskelkochsaft ist der Respirationsquotient annähernd gleich 1; die CO_2-Produktion kann also auf die Verbrennung von Glucose und Milchsäure bezogen werden; demnach entsprechen 1,70 ccm CO_2 1,7 × 1,3364 mg verbrannten Kohlenhydrats, das sind *2,27 mg*. In dem gleich angesetzten Versuch C sind neben der Verbrennung von 2,27 mg Kohlenhydrats 6,8 mg Milchsäure und 16 mg Glucose gebildet worden, dabei 2,7 mg anorganischer H_3PO_4 verschwunden.

Unter dem Zusatz von Muskelkochsaft ist im Versuch B der O_2-Verbrauch gestiegen (nicht im gleichen Maße die CO_2-Produktion), der Respirationsquotient ergibt den Wert von 0,76. Trotzdem berechnen wir hier den O_2-Verbrauch auf Verbrennung von Kohlenhydrat bzw. Milchsäure und berechnen daraus 2,54 × 1,3364 mg verbrannten Kohlenhydrats, das sind 3,39 mg.

Die intermediären Kohlenhydratumsätze ergaben einen Verlust von 3,8 mg Milchsäure, 1 mg Glucose und Verschwinden von 2,6 mg

anorganischer H_2PO_4. Danach ist anzunehmen, daß durch Zusatz von Muskelkochsaft in der Hauptsache eine Steigerung der Atmung erzielt worden ist.

Versuch 5 (Journal II, 184).

10 g Muskulatur eines gut genährten Meerschweinchens werden im Verhältnis von 10 g zu 100 ccm Ringerlösung (ohne $NaHCO_3$-Zusatz und mit 0,1 Proz. Glucose) nach Verreibung aufgeschwemmt. Je 30 ccm der Suspension werden in kalibrierten 300-ccm-Gefäßen 50 Minuten lang bei 40° C geschüttelt, nachdem zu Portion B und C 10 Einheiten Insulin auf 100 ccm der Suspension zugesetzt worden waren.

Eiweißgehalt der Suspension = 1,38 Proz.

Versuch A (*ohne* Insulinzusatz), berechnet auf 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 1,52 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 1,56 „
Respirations Quotient . . . . . . = 1

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,13 ccm.

Versuch B (mit Insulinzusatz von 10 Einheiten Insulin in vitro), berechnet auf 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 1,40 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 1,54 „
Respirationsquotient . . . . . . = 0,91

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,12 ccm.

	Zuckergehalt berechnet als Glucose mg	Milchsäure mg	Anorganisches H_3PO_4 mg
Versuch B (mit Insulinzusatz).			
Vorher	131	14,3	9,1
Nachher . . .	142	10,8	5,0
Bilanz	+ 11	— 3,5	— 4,1
Versuch C (ohne Insulinzusatz), berechnet auf 10 g Muskulatur.			
Vorher	131	14,3	9,1
Nachher . . .	136	19,3	8,6
Bilanz	+ 5	+ 5,0	— 0,5

Zunächst ergibt sich für die Atmungswerte der Muskulatur, mit und ohne Insulinzusatz eine fast völlige Kongruenz. Der Insulinzusatz hat die Atmung nicht beeinflußt! Berechnen wir, in Anbetracht dessen, daß der Respirationsquotient annähernd gleich 1 ist, den O_2-Verbrauch auf Verbrennung von Kohlenhydrat bzw. Milchsäure, so ergibt sich ein Wert von $1{,}56 \times 1{,}3364$ mg = 2,1 mg, bzw. von $1{,}54 \times 1{,}3364$ mg = 2,06 mg bei Insulinzusatz.

Von außerordentlich klarer Übersicht sind nun die intermediären Kohlenhydratverhältnisse des Muskels bei Insulinzusatz und ohne Insulinzusatz. Ohne Insulinzusatz finden wir Bildung von 5 mg Milch-

säure und 5 mg Glucose bei einem Defizit von 0,5 mg anorganischer H_3PO_4, bei Insulinzusatz entsteht ein Minus von 3,5 mg Milchsäure, dabei ein Plus von 11 mg Glucose bei einem Defizit von 4,1 mg anorganischer H_3PO_4. *Das läßt hier nur den einen Schluß zu, daß das Insulin den Aufbauvorgang des Zuckers aus Milchsäure bewirkt hat unter Bildung eines phosphorylierten Zuckers, ohne daß eine Steigerung der Atmung der Muskulatur stattgefunden hat.*

Versuch 6 (Journal II, 189).

10 g Muskulatur eines gut genährten Meerschweinchens, das um 10 Uhr vormittags 10 Einheiten Insulin intraperitoneal bekommen hat und um 12 Uhr mittags getötet worden ist, werden im Verhältnis von 10 g zu 100 ccm Ringerlösung (ohne $NaHCO_3$-Zusatz, mit 0,1 Proz. Glucose) nach Verreiben suspendiert. Je 30 ccm werden in je einem kalibrierten 300-ccm-Gefäß bei 40° C 50 Minuten lang unter Luft geschüttelt.

Eiweißgehalt der Suspension = 1,36 Proz.

Für 10 g Muskulatur berechnet:

CO_2-Produktion	= 1,50 ccm
O_2-Verbrauch	= 1,70 „
Respirationsquotient	= 0,88

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,25 ccm.

Für 10 g Muskulatur berechnet:

	Zuckergehalt berechnet als Glucose mg	Milchsäure mg	Anorganisches H_3PO_4 mg
Vorher	138	16,8	9,1
Nachher . . .	126	11,3	8,3
Bilanz	— 12	— 5,5	— 0,8

Der O_2-Verbrauch von 1,70 ccm läßt, unbeschadet der Tatsache, daß der Respirationsquotient nicht 1 ist, die Verbrauchsgröße an Kohlenhydrat bzw. Milchsäure zu $1,7 \times 1,3364$ mg = 2,27 mg berechnen. Die intermediären Kohlenhydratverhältnisse zeigen Verschwinden von Glucose (die nicht veratmet ist) und Verschwinden von Milchsäure; die anorganische H_3PO_4 weist nur ein geringes Minus von 0,5 mg auf. Man geht wohl kaum fehl, wenn man die negativen Kohlenhydratwerte, die nicht einer Verbrennung entsprechen können, als Folgen intermediärer Zwischenzuckerbildung betrachtet.

Zusammenfassung der Versuche an der Muskulatur wohlgenährter Meerschweinchen.

Welchen Wert hat die Atmung der Muskulatur in der Ringersuspension bei 40° C und Luftdurchschüttelung während 50 Minuten, wenn die Ringerlösung kein Bicarbonat enthält, dagegen 0,1 Proz. Glucose?

Tabelle I.

Nr.	CO_2-Produktion ccm	O_2-Verbrauch ccm	Respirationsquotient
1	1,49	1,60	0,9
2	1,46	1,34	1,08
4	1,70	1,60	1,06
5	1,52	1,56	1,13

Die Werte (reduziert auf 0^0 und 760 mm Hg) halten sich im Respirationsquotienten um 1, die Größe des O_2-Verbrauchs und der CO_2-Produktion schwankt nur in engen Grenzen. Berechnet man den O_2-Verbrauch auf 1 g Muskulatur, so ergeben sich ähnlich enge Werte.

Tabelle II.

O_2-Verbrauch pro Gramm Eiweiß der Muskulatur in der Ringersuspension.

Nr.	O_2 ccm
1	1,47
2	1,34
4	1,11
5	1,13
Durchschnittswert .	1,26

Steigert Insulinzusatz in vitro oder in vivo den Atmungswert? Ändert er den Respirationsquotienten?

Tabelle III.

Nr.		CO_2-Produktion ccm	O_2-Verbrauch ccm	Respirationsquotient
3	Insulin in vitro	1,40	1,37	1,02
5	Insulin in vitro	1,40	1,54	0,91
6	Insulin in vivo	1,50	1,70	0,88

Der Vergleich der Tabellen I und III ergibt keinen Unterschied! Der Durchschnittswert berechnet auf 1 g Eiweiß der Ringersuspension ergibt ebenfalls keinen Unterschied. (Sehr beweisend ist in specie noch Versuch 5 in beiden Kontrollen.)

Tabelle IV.

O_2-Verbrauch pro Gramm Eiweiß der Muskulatur in der Ringersuspension bei Insulinisierung.

Nr.		O_2 ccm
3	Insulin in vitro	1,33
5	Insulin in vitro	1,12
6	Insulin in vivo	1,25
Durchschnittswert . . .		1,23

Der Durchschnittswert ist der gleiche (1,23 gegen 1,26 ccm). *Wir stehen daher nicht an, zu sagen, daß das Insulin den Atmungswert der Muskulatur eines wohlgenährten Meerschweinchens nicht beeinflußt, wenigstens nicht nach den Versuchen am Muskelbrei.* Daß aber am Muskelbrei eine solche Beeinflussung leicht möglich ist, zeigt der Versuch 4 mit Zusatz von Muskelkochsaft: *Unter dem Einfluß des zugesetzten Muskelkochsafts steigt der Atmungswert des Kontrollversuchs, berechnet auf 1 g Eiweiß, von 1,11 auf 1,83!*

Daß das Insulin eine Änderung des respiratorischen Quotienten herbeiführt, glauben wir nach der Tabelle III nicht annehmen zu können.

Trotzdem bewirkt das Insulin eine gewaltige Änderung in den intermediären Abbau- und Aufbauverhältnissen bei der Muskulatur, wie sich aus folgendem ergibt.

Alle im vorhergehenden angeführten Atmungsversuche am Muskelbrei, bei denen gleichzeitig die intermediären Kohlenhydratverhältnisse studiert wurden, zeigen bereits beim Ansetzen der Versuche eine Erhöhung des Zuckerwerts der Ringerlösung über 0,1 Proz. Glucose, d. h. über den Wert, der der Ringerlösung in der Versuchsanordnung gegeben war. Dieses Plus an Zucker muß aus dem Glykogen bzw. aus intermediären Zwischenzuckern der Muskulatur stammen, möglicherweise auch aus phosphoryliertem Zucker. Der gleichen Quelle muß auch die bereits zu Beginn des Versuchs auffindbare Milchsäure entstammen. Sollte die Milchsäure aus der d-Fructosediphosphorsäure der Muskulatur entstammen, so müßte dem Zuwachs an Milchsäure im intermediären Versuch ein entsprechender Zuwachs an anorganischer Phosphorsäure entsprechen, dies ist aber, wie wir sehen werden, nicht der Fall. Nennen wir den Vorgang der Milchsäurebildung (aus Zucker) Glykolyse, den Vorgang des Verschwindens von Milchsäure, soweit diese nicht veratmet ist, Glykogenese, so ergibt sich zunächst folgende Beziehung zwischen Atmungswert und Glykolyse, den man den *Meyerhof*schen Quotienten nennt:

$$\frac{\text{Verbrannte Milchsäure}}{\text{Gebildete Milchsäure}} = \frac{\text{Atmung}}{\text{Glykolyse}}.$$

Wir stellen die Werte hier für die Normalversuche am Muskelbrei zusammen.

Tabelle V.

Nr.	I Veratmetes Kohlenhydrat mg	II Gebildete Milchsäure mg	Quotient I:II
1	2,14	17,4	1 : 8
2	1,95	12,0	1 : 6
4 A	2,27	6,8	1 : 3
5 A	2,1	5,0	1 : 2

Ganz anders liegen aber die Verhältnisse für die insulinisierte Muskulatur: Statt Glykolyse, d. h. Bildung von Milchsäure, verschwindet Milchsäure, d. h. es liegt eine Umkehr intermediärer Verhältnisse vor gegenüber der Norm:

Tabelle VI.

Nr.	I Veratmetes Kohlenhydrat mg	II Verschwundene Milchsäure mg	Quotient I/II
3	1,87	17	1 : 9
5	2,06	3,5	1 : 1,7
6	2,27	5,5	1 : 2,0

Aber weder kann in der Muskulatur für die normalen Verhältnisse die gesamte gebildete Milchsäure aus phosphoryliertem Kohlenhydrat stammen, noch ist die Annahme berechtigt, daß die verschwundene Milchsäure bei der insulinisierten Muskulatur, soweit sie nicht veratmet ist, an anorganische H_3PO_4 gebunden bleibt. Die Bindung an H_3PO_4 kann nur eine intermediäre Phase im Aufbauprozeß darstellen, wie wir das in unserer achten Mitteilung zu zeigen bemüht waren.

Da nun der Quotient veratmetes Kohlenhydrat zur verschwundenen Milchsäure kleiner als 1 ist, so ist dadurch zum Ausdruck gebracht, daß die Milchsäure, soweit sie nicht als veratmet betrachtet werden darf, einer anderen Zustandsform zum Übergang gedient hat, nämlich einem Zucker, der über den phosphorylierten Zucker hinaus den Charakter des Zwischenzuckers hat, in dem Sinne, wie wir das an der Leber in der achten Mitteilung zu zeigen bemüht waren. Die Reihenfolge geht über die Milchsäure—d-Fructosediphosphorsäure—Lävulose—Zwischenzucker—Glykogen. Daß die Zwischenzucker unter Insulinisierung bei der Aufspaltung hauptsächlich linksdrehenden Zucker ergaben, hat unsere sechste Mitteilung gezeigt. *In diesem Sinne dürfen wir das Verschwinden von Milchsäure als* **Glykogenese** *bezeichnen und zugleich behaupten, daß am Muskel das Insulin nicht den Atmungsprozeß aktiviert, sondern die Glykogenese.*

Da die Verhältnisse beim Muskelbrei so übersichtlich hinsichtlich der Änderung der intermediären Kohlenhydratverhältnisse liegen, mögen hier die in gleicher Weise angestellten intermediären Studien am Leberbrei unter Beobachtung der Atmung (vgl. unsere siebente Mitteilung) zum Vergleich mit herangezogen werden (Tab. VII).

Diese Versuche zeigen, daß die Verhältnisse vielleicht schwieriger zu übersehen sind als an der Muskulatur, daß indessen die inter-

mediären Verhältnisse, die an der Leber hauptsächlich wohl vom Glykogengehalt der Leber einerseits und vom Zuckergehalt der Ringerlösung andererseits abhängen, doch in ganz gleicher Richtung wie bei der Muskulatur liegen, auch wenn die Insulinwirkung an den angezogenen Versuchen nicht evident ist, wie man sie mitunter zu finden Gelegenheit hat, wenn z. B. die Tiere durch Insulinisierung im Stadium eines hypoglykämischen Komplexes sich finden (vgl. hierzu auch die Tabellen in unserer achten Mitteilung).

Tabelle VII.

Versuche an Normallebern.

Nr.		I Veratmetes Kohlenhydrat mg	I Gebildete (+) bzw. verschwundene (—) Milchsäure mg	Quotient I : II	
1	Ringerlösung enthält 0,1 Proz. Glucose u. 0,11 Proz. $NaHCO_3$	6,1	— 7,2	1 : 1,2	Glykogenese
2	Dasselbe	9,4	0	1 : 0	—
4	Ringerlösung enthält 0,1 Proz. Glucose, aber kein $NaHCO_3$	2,1	— 3	1 : 1,5	Glykogenese
5	Dasselbe mit Zusatz von Hefenextrakt	2,2	— 9,7	1 : 4,5	Glykogenese
6	Ringerlös. enthält 0,1 Proz. Glucose, aber kein $NaHCO_3$, Zusatz von Insulin in vitro	1,9	+ 8	1 : 4	Glykolyse
20 A	Ringerlösung enthält 0,5 Proz. Glucose, aber kein $NaHCO_3$	2,3	+ 16	1 : 7	Glykolyse
20 B	Dasselbe, aber mit Zusatz von Insulin	2,4	+ 7	1 : 3	Glykolyse
19	Ringerlösung enthält 0,5 Proz. Glucose, aber kein $NaHCO_3$	2,9	— 55	1 : 19	Glykogenese

B. Versuche an hungernden Tieren (Meerschweinchen).

Versuch 8 (Journal III, 5).

Ein Meerschweinchen, das 48 Stunden gehungert hat, erhält um 9 Uhr morgens 20 Einheiten Insulin „*Welcome*“ intraperitoneal. Tötung um 12 Uhr, nachdem sich die ersten Anzeichen des hypoglykämischen Komplexes bereits gezeigt hatten.

Die Muskulatur wird im Verhältnis 10: 100 mit Ringerlösung (ohne $NaHCO_3$, mit 0,1 Proz. Glucose) suspendiert und in drei Portionen (A, B, C) zu je 30 ccm in kalibrierten 300-ccm-Gefäßen bei 40° C 50 Minuten lang durchschüttelt. Zu B werden auf 100 ccm 4 Einheiten Insulin zugesetzt.

Eiweißgehalt der Suspension = 1,54 Proz.

Versuch A (ohne weiteren Insulinzusatz), berechnet auf 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 0,83 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 1,24 „
Respirationsquotient . . . . = 0,67

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 0,81 ccm.

Versuch B (mit Zusatz von Insulin in vitro), berechnet auf 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 0,975 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 1,23 „
Respirationsquotient . . . . = 0,79

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 0,8 ccm.

	Zuckergehalt berechnet als Glucose mg	Milchsäure mg	Anorganisches H_3PO_4 mg
Versuch B (mit Insulinzusatz), berechnet auf 10 g Muskulatur.			
Vorher	130	12,0	10,3
Nachher . .	144	6,0	9,0
Bilanz	+ 14	— 6	— 1,3
Versuch C (ohne Insulinzusatz), berechnet auf 10 g Muskulatur.			
Vorher	130	12,0	10,3
Nachher . . .	150	9,8	8,5
Bilanz	+ 20	— 2,2	— 1,6

Obgleich der Respirationsquotient wesentlich niedriger als 1 liegt und darauf hinweist, daß Sauerstoff benötigt worden ist, ohne daß dieser einzig verbranntem Kohlenhydrat zugute kommt, berechnen wir aus dem Sauerstoffverbrauch von 1,24 bzw. 1,23 ccm die Größe verbrannten Kohlenhydrats bzw. Milchsäure für A = 1,24 × 1,3364 mg = 1,66 mg, für B (mit Insulinzusatz) = 1,23 × 1,3364 mg = 1,64 mg. Die intermediären Kohlenhydratumsätze ergaben im Versuch ohne Insulinzusatz eine Ausschüttung (bzw. Bildung) von 20 mg Glucose, bei einem Defizit von 2,2 mg Milchsäure und einem Defizit von 1,6 mg anorganischer H_3PO_4, im Versuche mit Insulin ist die Ausschüttung der Glucose geringer (+ 14 mg), dagegen das Defizit an Milchsäure größer (— 6 mg) bei einem Defizit anorganischer H_3PO_4 von 1,3 mg.

Versuch 9 (Journal III, 8).

Ein Meerschweinchen, das 24 Stunden gehungert hat, erhält 9 Uhr 30 Minuten vormittags 40 Einheiten Insulin (*Welcome*) intraperitoneal. Es wird um 12 Uhr bei ausgesprochener Atonie getötet.

Die Muskulatur wird nach Verreiben aufgeschwemmt im Verhältnis von 10 : 100 mit Ringerlösung, die kein $NaHCO_3$, aber 0,1 Proz. Glucose enthält. Je 30 ccm der Suspension werden in drei Portionen (A, B, C) in je 300-ccm-Gefäßen (kalibriert) bei 40° C 50 Minuten lang unter Luft geschüttelt. Zu B ist noch 1 Einheit Insulin auf 100 ccm zugesetzt worden.

Eiweißgehalt der Suspension = 0,85 Proz.

Versuch A (ohne weiteren Insulinzusatz), berechnet auf 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 0,61 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 1,45 „
Respirationsquotient . . . . = 0,42

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,71 ccm.

Versuch B (mit Insulinzusatz), berechnet auf 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 0,531 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 1,0 „
Respirationsquotient . . . . = 0,53

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,17 ccm.

	Zuckergehalt berechnet als Glucose mg	Milchsäure mg	Anorganisches H_3PO_4 mg
Versuch B (mit Insulinzusatz), berechnet auf 10 g Muskulatur.			
Vorher	158	9,1	17,7
Nachher . . .	148	5,2	9,0
Bilanz	— 10	— 3,9	— 8,7
Versuch C (ohne Insulinzusatz), berechnet auf 10 g Muskulatur.			
Vorher	158	9,1	17,7
Nachher . . .	153	5,7	8,0
Bilanz	— 5	— 3,4	— 9,7

Berechnen wir — obwohl der Respirationsquotient so tief liegt, daß sein Wert nicht allein auf die Verbrennung von Kohlenhydrat hinweist, sondern auf das Eintreten sauerstoffungesättigter Körper aus der Fettreihe — den O_2-Verbrauch im Versuch A und B auf die Verbrennung von Kohlenhydrat bzw. Milchsäure, so ergibt sich für Versuch A (ohne Insulinzusatz) 1,45 × 1,3364 mg = 1,94 mg, für Versuch B (mit Insulinzusatz) 1,0 × 1,3364 mg = 1,34 mg. Der Intermediärversuch (ohne Insulinzusatz) ergibt ein Verschwinden von 5 mg Glucose, ein Defizit von 3,4 mg Milchsäure und den hohen Wert von — 9,7 mg anorganischer H_3PO_4. Im Parallelversuch mit Zusatz von Insulin ergibt sich ein Defizit von 10 mg Glucose, 3,9 mg Milchsäure, 8,7 mg anorganischer H_3PO_4. Da sich das Defizit in beiden Versuchen nicht von der Verbrennung von Kohlenhydrat bzw. Milchsäure herleiten kann (es sind im Höchstfalle 1,94 bzw. 1,34 mg Kohlenhydrat verbrannt worden), so ist die Ausdeutung nur so möglich, daß sich hier aus Milchsäure Hexosediphosphorsäure gebildet hat, deren Reduktionswert ein anderer ist und damit zur Änderung des Glucosewertes geführt hat. Wir haben hier auch wieder ein Beispiel dafür, wie fest unter Umständen Insulin die anorganische H_3PO_4 zu verankern vermag. (Wirkung des Insulins als Kinase der Phosphatase.)

Versuch 10 (Journal III, 11).

Ein Meerschweinchen, das 48 Stunden gehungert hat und stark ermattet ist, wird durch Nackenschlag getötet. 10 g Muskulatur, fein zerrieben, werden suspendiert im Verhältnis 10 : 100 mit Ringerlösung, die kein $NaHCO_3$, aber 0,1 Proz. Glucose enthält. Je 30 ccm der Suspension (A, B, C) werden in drei kalibrierten 300-ccm-Gefäßen 50 Minuten lang

bei 40° C unter Luft geschüttelt, nachdem zu B 2 Einheiten Insulin für 100 ccm Suspension zugefügt worden war.

Eiweißgehalt der Suspension = 2,47 Proz.

Versuch A (ohne Insulinzusatz), berechnet für 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 0,60 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 1,70 „
Respirationsquotient . . . . . . = 0,35

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 0,69 ccm.

Versuch B (mit Insulinzusatz in vitro), berechnet für 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 0,65 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 0,141 „
Respirationsquotient . . . . . . = 0,46

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 0,57 ccm.

	Zuckergehalt berechnet als Glucose mg	Milchsäure mg	Anorganisches H_3PO_4 mg
Versuch B (mit Insulinzusatz) berechnet für 10 g Muskulatur.			
Vorher	119	10,6	8,5
Nachher . . .	126	5,3	11,0
Bilanz	+ 7	— 5,3	+ 2,5
Versuch C (ohne Insulinzusatz), berechnet für 10 g Muskulatur.			
Vorher	119	10,6	8,5
Nachher . . .	133	8,4	9,0
Bilanz	+ 14	— 2,2	+ 0,5

Wir berechnen — trotz der niedrigen respiratorischen Quotienten — den O_2-Verbrauch auf Kohlenhydrat- bzw. Milchsäureverbrennung: für A (ohne Insulinzusatz) zu 1,70 × 1,3364 mg = 2,27 mg, für B (mit Insulinzusatz) zu 1,41 × 1,3364 mg = 1,88 mg. Die intermediären Kohlenhydratumsätze ergaben ohne Insulinzusatz eine Bildung von 14 mg Glucose, das Defizit an Milchsäure beträgt 2,2 mg, die anorganische H_3PO_4 hat sich nicht wesentlich geändert (+ 0,5 mg). Bei Insulinzusatz ist die Zuckerbildung geringer, das Defizit an Milchsäure größer (— 5,3 mg), der Wert für anorganische H_3PO_4 ist auf + 2,5 mg angewachsen.

Versuch 11 (Journal III, 16).

Ein Meerschweinchen, das 24 Stunden gehungert hat, erhält um 10 Uhr morgens 5 Einheiten Insulin (*B.* und *Welcome*) intraperitoneal. Es bleibt ohne hypoglykämischen Komplex bis 12 Uhr, wo es getötet wird.

Die Muskulatur wird nach Verreibung mit Ringerlösung (ohne $NaHCO_3$, aber mit 0,1 Proz. Glucose) im Verhältnis von 10 : 100 aufgeschwemmt. Je 30 ccm werden in je drei kalibrierten 300-ccm-Gefäßen (A, B, C) bei 40° C 50 Minuten lang unter Luft geschüttelt. Zu B wurden hinzugefügt 2 Einheiten Insulin für 100 ccm Suspension.

Eiweißgehalt der Suspension = 0,86 Proz.

Versuch A (ohne Insulinzusatz), berechnet für 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion	= 0,775 ccm
O_2-Verbrauch	= 1,75 „
Respirationsquotient	= 0,44

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 2,03 ccm.

Versuch B (mit Insulinzusatz), berechnet für 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion	= 0,74 ccm
O_2-Verbrauch	= 1,65 „
Respirationsquotient	= 0,45

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,92 ccm.

	Zuckergehalt berechnet als Glucose mg	Milchsäure mg	Anorganisches H_3PO_4 mg
Versuch B (mit Insulinzusatz), berechnet für 10 g Muskulatur			
Vorher	98	8,7	8,0
Nachher . . .	94	4,1	7,5
Bilanz	— 4	— 4,6	— 0,5
Versuch C (ohne Insulinzusatz), berechnet für 10 g Muskulatur.			
Vorher	98	8,7	8,0
Nachher . . .	93	8,4	7,0
Bilanz	— 5	— 0,3	— 1,0

Berechnen wir trotz niedriger respiratorischer Quotienten den O_2-Verbrauch auf Kohlenhydrat bzw. Milchsäure, so ergibt sich für A (ohne Insulinzusatz) für 10 g Muskulatur = 1,75 × 1,3364 mg = 2,34 mg, für B (mit Insulinzusatz) = 1,65 × 1,3364 mg = 2,21 mg.

Die intermediären Kohlenhydratverhältnisse zeigen ein Zuckerdefizit und bei dem Zusatz von Insulin ein höheres Milchsäuredefizit, während die Werte für anorganisches H_3PO_4 sowohl mit wie ohne Insulinzusatz nicht wesentlich geändert sind (— 1,0 bzw. — 0,5 mg). Das Defizit an Glucose und Milchsäure ist bei nachträglichem Zusatz von Insulin noch größer als ohne und übertrifft die etwaige Größe veratmeten Kohlenhydrats; es muß also hier ein Umbau der Kohlenhydrate über die Milchsäure hin stattgefunden haben.

Versuch 12 (Journal III, 18).

Ein Meerschweinchen, das 72 Stunden gehungert hat, erhält morgens 8 Uhr 30 Minuten 10 Einheiten Insulin (*B.* und *Welcome*) intraperitoneal. Nachdem das Tier alsbald atonisch geworden ist und um 1 Uhr einen hypoglykämischen Krampfkomplex bekommen hat, wird es um 1 Uhr getötet.

Die Muskulatur wird nach feiner Verreibung mit Ringerlösung, die keine $NaHCO_3$, aber 0,1 Proz. Glucose enthält, suspendiert im Verhältnis 10 : 100. Drei Portionen zu je 30 ccm (A, B, C) werden in kalibrierten 300-ccm-Gefäßen bei 40° C 50 Minuten lang mit Luft geschüttelt, nachdem zu B (für 100 ccm Suspension 2 Einheiten) Insulin zugesetzt worden war.

Eiweißgehalt der Suspension = 1,16 Proz.

Versuch A (ohne Insulinzusatz), berechnet für 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 1,71 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 3,22 „
Respirationsquotient . . . . = 0,53

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 2,78 ccm.

Versuch B (mit Insulinzusatz), berechnet für 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 1,63 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 2,35 „
Respirationsquotient . . . . = 0,69

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 2,03 ccm.

	Zuckergehalt berechnet als Glucose mg	Milchsäure mg	Anorganisches H_3PO_4 mg
Versuch B (mit Insulinzusatz), berechnet für 10 g Muskulatur.			
Vorher	94	9,0	16
Nachher . . .	98	5,0	17,5
Bilanz	+ 4	— 4,0	+ 1,5
Versuch C (ohne Insulinzusatz), berechnet für 10 g Muskulatur.			
Vorher	94	9,0	16
Nachher . . .	100,5	5,4	17,5
Bilanz	+ 6,5	— 3,6	+ 1,5

Berechnet man trotz der niedrigen respiratorischen Quotienten den O_2-Verbrauch auf Kohlenhydrat- bzw. Milchsäureverbrennung, so ergibt sich für 10 g Muskulatur (ohne Insulinzusatz) = 3,22 × 1,3364 mg = 4,3 mg, für 10 g Muskulatur mit Insulinzusatz = 2,35 × 1,3364 mg = 3,14 mg. In diesen Grenzen liegt hier das Defizit der Milchsäure (— 3,6 bzw. — 4,0 mg), indessen zeigt sich doch ein Plus an 6,5 mg Glucose bzw. 4 mg Glucose. Da, wie wir weiter unten ausführen werden, im Hunger die Bildung von Kohlenhydraten aus Fett in Frage kommt, so ist auch hier die Bildung von Zucker aus Fett wahrscheinlich und in diesem Sinne das Defizit an Milchsäure, wenigstens zum Teil auf den Umbau zu Zwischenzuckern zum Glykogen hin, anzunehmen. Die Werte für anorganische H_3PO_4 bewegen sich nur in geringen positiven Werten des Zuwachses.

Versuch 13 (Journal III, 21).

Ein Meerschweinchen, das 60 Stunden gehungert hat, wird getötet und die Muskulatur im Verhältnis von 10 : 100 nach feiner Verreibung mit Ringerlösung, die kein $NaHCO_3$, aber 0,1 Proz. Glucose enthält, aufgeschwemmt.

Je 30 ccm werden in drei kalibrierten 300-ccm-Gefäßen (A, B, C) bei 40° C 50 Minuten lang unter Luft geschüttelt, nachdem zu B *2 ccm* Hefekochsaft zugesetzt worden war.

Eiweißgehalt der Suspension = 1,3 Proz.

Versuch A (ohne Hefekochsaft), berechnet auf 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 2,43 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 2,54 „
Respirationsquotient . . . . . . = 0,96

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,95 ccm.

Versuch B (mit Hefekochsaft), berechnet auf 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 1,81 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 2,94 „
Respirationsquotient . . . . . . = 0,62

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 2,28 ccm

	Zuckergehalt berechnet als Glucose mg	Milchsäure mg	Anorganisches H_3PO_4 mg
Versuch B (mit Hefekochsaft), berechnet für 10 g Muskulatur.			
Vorher	103	14,5	14,0
Nachher . . .	106	3,4	14,0
Bilanz	+ 3	— 10,1	± 0,0
Versuch C (ohne Hefekochsaft), berechnet für 10 g Muskulatur.			
Vorher	103	14,5	14,0
Nachher . . .	99	13,6	15,0
Bilanz	— 4	— 0,9	+ 1,0

In dem Falle A (ohne Hefekochsaft) weist der Respirationsquotient von annähernd 1 auf die Verbrennung von Kohlenhydrat hin, so daß es wohl berechtigt ist, für A auf 10 g Muskulatur aus dem O_2-Verbrauch die Verbrennung von $2,54 \times 1,3364$ mg = 3,4 mg zu berechnen: für B (Hefekochsaftzusatz) waren $2,94 \times 1,3364$ mg = 3,8 mg zu berechnen. Der erstere Wert deckt sich annähernd mit dem Defizit von Milchsäure und Glucose (siehe C), der letztere Wert von 3,8 mg ist weit geringer als das Milchsäuredefizit; da unter Hefekochsaft hier eine Vermehrung der Glucose zustande gekommen ist, so ist zweifelsohne das starke Milchsäuredefizit in erster Linie auf Zuckerumbau zum Glykogen hin zurückzuführen. Die anorganischen H_3PO_4-Werte haben kaum eine Änderung erfahren.

Versuch 14 (Journal III, 23).

Ein Meerschweinchen, das 60 Stunden gehungert hat, erhält 9 Uhr vormittags 10 Einheiten Insulin (*Burrough* und *Welcome*) intraperitoneal injiziert. Das Tier, das stark atonisch wird, wird um 11 Uhr 30 Minuten vormittags getötet.

Die Muskulatur wird nach Verreiben aufgeschwemmt mit Ringerlösung, die kein $NaHCO_3$, aber 0,1 Proz. Glucose enthält, im Verhältnis von 10 : 100. Je 30 ccm werden in drei kalibrierten 300-ccm-Gefäßen (A, B, C) unter Luft bei 40° C 50 Minuten lang geschüttelt. Zu B waren noch zugesetzt worden 1 Einheit Insulin auf 100 Suspension.

Eiweißgehalt der Suspension = 1,2 Proz.

Versuch A (ohne Insulinzusatz), berechnet auf 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 0,70 ccm
O_2-Verbrauch . . . . = 1,70 „
Respirationsquotient . . . . . . = 0,41

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,42 ccm.

Versuch B (mit Insulinzusatz), berechnet für 10 g Muskulatur.

CO_2-Produktion . . . . = 0,63 ccm
O_2-Verbrauch. . . . . = 1,71 „
Respirationsquotient . . . . . . = 0,36

O_2-Verbrauch, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur = 1,42 ccm.

	Zuckergehalt berechnet als Glucose mg	Milchsäure mg	Anorganisches H_3PO_4 mg
Versuch B (mit Insulinzusatz), berechnet für 10 g Muskulatur.			
Vorher	99	5,0	3,5
Nachher . . .	96	4,5	3,0
Bilanz	— 3	— 0,5	— 0,5
Versuch C (ohne Insulinzusatz), berechnet für 10 g Muskulatur.			
Vorher	99	5	3,5
Nachher . . .	111	4	3,5
Bilnnz	+ 12	— 1	± 0

Berechnet man trotz des niedrigen respiratorischen Quotienten den O_2-Verbrauch auf Verbrennung von Kohlenhydrat, so ergibt sich für 10 g Muskulatur (mit und ohne Insulinzusatz) 1,7 × 1,3364 mg = 2,27 mg. In diesen Grenzen hält sich das Zuckerdefizit bei B (mit Insulinzusatz), während ohne Insulinzusatz eine stärkere Zuckerausschüttung stattgefunden hat.

Zusammenfassung.

Fassen wir das Ergebnis der Versuche an der Muskulatur hungernder Meerschweinchen zusammen, so ergibt sich zunächst für den respiratorischen Quotienten folgende Zusammenstellung.

Tabelle VIII.

Ohne Insulin in vivo und in vitro	Mit Insulin in vivo	Mit Insulin in vitro	Insulin in vivo und in vitro
Für 24stündigen Hunger.			
	Versuch 9 A 0,42		Versuch 9 B 0,53
	Versuch 11 A 0,44		Versuch 11 B 0,45
Für 48stündigen Hunger.			
Versuch 10 A 0,35	Versuch 8 A 0,67	Versuch 10 B 0,57	Versuch 8 B 0,79

Tabelle VIII (Fortsetzung).

Ohne Insulin in vivo und in vitro	Mit Insulin in vivo	Mit Insulin in vitro	Insulin in vivo und in vitro
	Für 60stündigen Hunger.		
Versuch 13 A 0,96	Versuch 14 A 0,41	Versuch 13 B (mit Zusatz von Hefekochsaft) 0,62	Versuch 14 B 0,36
	Für 72stündigen Hunger.		
Versuch 12 A 0,53			Versuch 12 B 0,69

Aus dieser Tabelle VIII wird ersichtlich, daß im Hungerzustande, ganz gleichgültig, ob Insulin in vivo oder vitro verwandt wird, bis auf eine Ausnahme, der Respirationsquotient im Atmungsversuch am Muskelbrei Werte ergibt, die erheblich unter 1 liegen, was uns zu der Annahme berechtigt, daß ein Teil des Sauerstoffs nicht zur Veratmung von Kohlenhydrat bzw. Milchsäure benutzt wird, sondern zur Bildung sauerstoffgesättigterer Verbindungen (Kohlenhydraten) aus sauerstoffungesättigten (Fetten). Daß im besonderen das Insulin den respiratorischen Quotienten herunterdrückt, wie wir es in unserer Mitteilung für die Hungerleber fanden, können wir hier für die Muskulatur nicht finden.

Hinsichtlich der Größe des O_2-Verbrauchs, berechnet auf 1 g Eiweiß der Muskulatur (Dauer des Atmungsversuchs 50 Minuten bei 40° C unter Durchlüftung) können wir folgende Zusammenstellung machen: Die Gaswerte reduziert auf 0° und 760 mm Hg.

Tabelle IX.

Ohne Insulin in vivo und in vitro ccm	Mit Insulin in vivo ccm	Mit Insulin in vitro ccm	Insulin in vivo und in vitro ccm
	Für 24stündigen Hunger.		
	Versuch 9 A 1,71 Versuch 11 A 2,03		Versuch 9 B 1,17 Versuch 11 B 1,92
	Für 48stündigen Hunger.		
Versuch 10 A 0,69	Versuch 8 A 0,81	Versuch 10 B 0,57	Versuch 8 B 0,79
	Für 60stündigen Hunger.		
Versuch 13 A 1,95	Versuch 14 A 1,42	Versuch 13 C (mit Zusatz von Hefenkochsaft 2,28	Versuch 14 B 1,42
	Für 72stündigen Hunger.		
	Versuch 12 A 2,78		Versuch 12b 2,03

Vergleichen wir die O_2-Werte der Muskelatmung der zum Teil insulinisierten Hungertiere mit den Werten für die Muskelatmung der normal genährten eventuell insulinisierten Tiere, so ergibt sich für den 24stündigen, den 60- und 70stündigen Hunger eine Erhöhung. *Es ist kein Zweifel, daß der O_2-Verbrauch der Muskulatur im Hunger gesteigert wird und daß das Insulin hier keine weitere Steigerung der O_2-Atmung hervorruft, so wenig wie ein solcher Nachweis an der normalen insulinisierten Muskulatur zu führen war.*

(Daß eine solche Erhöhung des O_2-Verbrauchs nicht dem Versucher entgehen kann, zeigen z. B. Versuch 4, wo Muskelkochsaft den O_2-Verbrauch auf 2,54 ccm gegenüber der Kontrolle mit 1,60 ccm steigert und Versuch 13 B, wo Zusatz von Hefekochsaft den Atmungswert auf 2,28 ccm gegenüber 1,95 ccm steigert.)

Vergleicht man unsere Erfahrungen mit denen, die wir an der Leber hinsichtlich der O_2-Atmung und ihrer Beeinflussung im Hunger durch Insulin gemacht haben, so müssen wir allerdings von vornherein bemerken, daß wir die Leberatmung hauptsächlich im 24stündigen Hunger untersucht haben und nur einmal im 72stündigen Hunger, daß wir aber auch dort nicht eine allenthalben auffindbare Steigerung des O_2-Wertes fanden; wir kamen für den Zusatz in vitro zu dem Schluß, daß Insulinzusatz in einigen Fällen eine Erhöhung des O_2-Wertes auslöst, in anderen Fällen aber die Wirkung nicht zu steigern oder herabzudrücken vermag; dagegen stellten wir bei in vivo gespritzten Tieren eine Erhöhung des O_2-Verbrauchs fest. *Einen gleichen Schluß können wir für die Muskulatur nicht ziehen.*

Wenden wir uns jetzt den intermediären Vorgängen in der Muskulatur (Glucose, Milchsäure, anorganische H_3PO_4) in ihrer Beziehung zur Atmung zu: Da (bis auf Versuch 14 A) der respiratorische Quotient wesentlich unter 1 liegt, so ist es unberechtigt, den O_2-Wert für die Berechnung verbrannten Kohlenhydrats zugrunde zu legen, wie es in den Diskussionen zu den einzelnen Versuchen geschehen ist, vielmehr ergibt sich die Notwendigkeit, aus den Kohlensäurewerten den Wert für verbranntes Kohlenhydrat zu berechnen. Diesen Wert setzen wir dann in Relation zu etwaiger gebildeter bzw. verschwundener Milchsäure, wie wir es oben bei der Beurteilung der normalen Muskulatur getan haben.

Wir finden bei der Beurteilung der gesamten Tabelle X überall nur negative Milchsäurewerte, demnach nicht einen Quotienten von verbranntem Kohlenhydrat zu Glykolyse, sondern zur Glykogenese, d. h. Verhältnisse, wie wir sie auch bei der Muskulatur normal ernährter Tiere unter dem Einfluß des Insulins gefunden haben. Der Quotient hält sich in den Grenzen von 1 : 3,0 bis 1 : 6, wobei die höchsten Werte allerdings auf die Versuche treffen, in denen Insulin in vitro zugefügt wurde (Versuch 11B, 9B, 10B, 8B), obwohl sich auch Ausnahmen finden (s. Versuch 14C). *Wir dürfen also schließen, daß Hunger wie Insulin eine Änderung in den intermediären Kohlenhydratumsatzverhältnissen eintreten lassen, indem beide eine Glykogenese bewirken*; während aber im Hunger bei der Muskulatur eine Änderung im Modus der Veratmung eintritt, indem der respiratorische Quotient sinkt auf Werte, die nur so ausgedeutet werden, daß ein Umbau sauerstoffungesättigter Körper (Fette) zu sauerstoffgesättigteren (Kohlenhydraten)

Tabelle X.

Nr.	Dauer des Hungerzustandes Stdn.	CO_2-Produktion während 50 Min. ccm	I Aus der CO_2-Produktion berechnetes, veratmetes Kohlenhydrat bzw. Milchsäure mg	II Gebildete Milchsäure (+) bzw. verschwundene Milchsäure (—) mg	Quotient I:II
11 A Insulin in vivo . . .	24	0,775	1,0	— 0,3	1:0,3
11 B Insulin in vivo und in vitro	24	0,74	1,0	— 4,6	1:4,6
9 A Insulin in vivo . . .	24	0,61	0,8	— 3,4	1:4,3
9 B Insulin in vivo und in vitro	24	0,531	0,7	— 3,9	1:5,6
10 A Ohne Insulin	48	0,69	0,9	— 2,2	1:2,4
10 B Mit Insulin in vitro .	48	0,65	0,9	— 5,3	1:6
8 A Insulin in vivo . . .	48	0,83	1,1	— 2,2	1:2
8 B Insulin in vivo und in vitro	48	0,975	1,3	— 6,0	1:4,6
13 A Ohne Insulin	60	2,43	3,2	— 0,9	1:0,3
13 B Mit Hefekochsaft in vitro	60	1,81	2,4	— 10,1	1:4,2
14 A Mit Insulin in vivo .	60	0,70	0,9	— 1	1:1,1
14 B Mit Insulin in vivo und in vitro	60	0,63	0,8	— 0,5	1:0,6
12 A Mit Insulin in vivo .	72	1,71	2,3	— 3,6	1:1,5
12 B Mit Insulin in vivo und in vitro	72	1,63	2,2	— 4,0	1:1,8

eintritt, äußert sich die Insulinwirkung nur in der Änderung der intermediären Kohlenhydratumsätze im Sinne des Aufbaus über die Milchsäure hinaus und ohne, daß die Oxydationsgröße der Atmung durch das Insulin beeinflußt wird. Da wir in unserer achten Mitteilung gezeigt haben, daß Insulin den Charakter der Kinase einer Phosphatese trägt, so kann man das auch so ausdrücken, daß diese Phosphatese von Insulin aktiviert wird, ohne daß die Atmungsgröße des Protoplasmas dabei zu wachsen braucht; das gilt wenigstens sicher für die Muskulatur nach unseren Versuchen; für die Versuche an der Leber reichen die Versuche unserer siebenten Mitteilung zur Beantwortung der Frage nicht aus, da wir nur drei Versuche an 24-Stunden-Hungertieren, die mit 0,1 Proz. Glucose angestellt sind, als Vergleich zur Verfügung haben und nicht länger gehende Hungerversuche (bis auf einen Versuch) angestellt haben. Immerhin seien sie der Vollständigkeit wegen noch einmal angefügt, wobei bemerkt werden muß, daß in diesen angezogenen Versuchen der Gehalt der Leber an Glykogen bzw. an Zwischenzucker ein hoher gewesen sein muß, da die Zuckerausschüttung im Versuch 7 + 340 mg Glucose, im Versuch 8 + 70 mg Glucose, im Versuch 9 + 40 mg, im Versuch 10 + 70 bis 80 mg Glucose beträgt.

Tabelle XI.

Versuche an Leberbrei von Meerschweinchen (VII. Mitteilung).

Nr.	Dauer des Hungerzustandes Stdn.	CO_2-Produktion während 50 Min. ccm	I Aus der CO_2-Produktion berechnetes, veratmetes Kohlenhydrat bzw. Milchsäure mg	II Gebildete Milchsäure (+) bzw. verschwundene Milchsäure mg	Quotient I/II
7 (2 Stunden vor dem Tode insulinisiert) .	24	2,24	3,0	+ 19	1 : 6 (Glykolyse)
8 A Ohne Insulin . . .	24	O_2-Verbrauch 3,0	Aus d. O_2-Verbrauch errechnet 4,0	± 0	1 : 0
8 B Mit Insulin in vitro	24	O_2-Verbrauch 3,82	Aus d. O_2-Verbrauch errechnet 5,1	+ 6	1 : 1,2 (Glykolyse)
9 A (2 Stunden vor dem Tode insulinisiert .	24	2,2	2,9	± 0	1 : 0
9 B Mit Insulinzusatz in vitro	24	1,5	2,0	+ 3	1 : 1,5 (Glykolyse)
10 A Ohne Insulin . . .	72	1,52	2,0	+ 26	1 : 13
10 B Mit Insulin in vitro	72	2,07	2,7	+ 42	1 : 15,6

Aus diesen Versuchen ist jedenfalls das eine ersichtlich, daß die Leber, solange sie noch ausschüttbares Material besitzt, eine positive Glykolyse aufweist und erst dann zur Glykogenese übergeht, wenn sie durch Glykogenmangel (Hunger) dazu gezwungen wird bzw. wenn sie stark insulinisiert wird oder aber, wenn das Angebot an Zucker sehr groß wird. In dieser Hinsicht sei der Versuch 16 (unserer siebenten Mitteilung) angeführt, bei der die Ringerlösung statt 0,1 Proz. Glucose 0,5 Proz. Glucose enthielt.

Das Meerschweinchen hatte 24 Stunden gehungert, der Leberbrei atmetete 50 Minuten bei 40° C. Zu einer Probe wurde Insulin zugefügt.

Ohne Insulin:

CO_2-Produktion = 1,75 ccm, entspricht = 2,3 mg Kohlenhydrat.

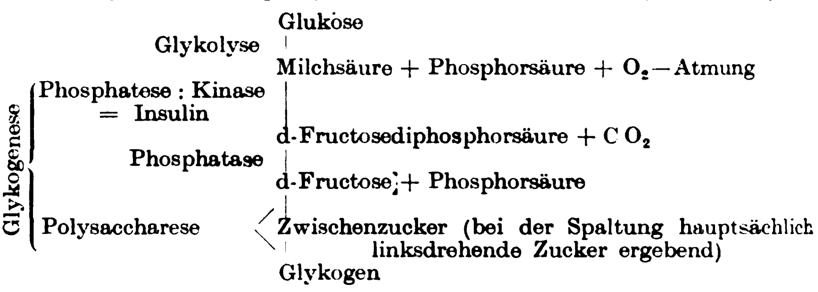
Mit Insulin in vitro:

CO_2-Produktion = 2,06 ccm, entspricht = 2,8 mg Kohlenhydrat.

Ohne Insulin werden 8 mg Milchsäure produziert (Glykolyse), Quotient = 1 : 3,5, mit Insulinzusatz verschwinden 8 mg Milchsäure (Glykogenese), Quotient = 1 : 3,5. Im gleichen Sinne verschwinden ohne Insulin 25 mg Glucose aus dem Reduktionswert, mit Insulin erhöht sich der Reduktionswert um 22 mg.

Das Ergebnis dieser Versuche dürfen wir in Erweiterung unserer früheren Versuche (erste bis siebente Mitteilung) folgendermaßen zusammenfassen.

Aus den früheren Ergebnissen, insbesondere aus dem Ergebnis der achten Mitteilung präzisieren wir das Schema der Kohlenhydratverwertung im Tierkörper für Leber und Muskulatur folgendermaßen:



Die glykogenhaltige Leber und Muskulatur eines normal genährten Tieres produzieren (glykolytisch) Milchsäure aus Glucose; sie veratmen O_2 unter Bildung eines bestimmten Verhältnisses von veratmetem Kohlenhydrat zu Milchsäure (Meyerhofscher Quotient).

Insulin (in vitro oder in vivo) ändert das Verhältnis von Atmung zur Milchsäure, indem der Milchsäurewert (d. h. die Glykolyse) sinkt oder Milchsäure sogar verschwindet, ein Prozeß der Glykogenese, der über die Milchsäure mit Hilfe der Phosphorsäure zunächst zur Bildung von d-Fructosediphosphorsäure führt. Dabei ändert Insulin als Kinase der Phosphatase den Atmungswert nicht. Die Bildung der d-Fructosediphosphorsäure, was wir als obligaten Vorgang ansehen, ist keine stabile, sondern diese wird wieder durch eine Phosphatase in d-Fructose zerlegt, aus der durch eine Polysaccharese der Aufbau zum Glykogen hin erfolgt. Die d-Fructosediphosphorsäure kann weder in der Leber noch in der Muskulatur als wesentliche Quelle der Milchsäurebildung angesprochen werden.

Im Hunger vergrößert sich bei Leber und Muskulatur der Atmungswert, gleichzeitig überwiegt die Glykogenese die Glykolyse. Aus dem niedrigen respiratorischen Quotienten, den die Hungerorgane aufweisen, ist die Annahme der Bildung von Kohlenhydraten aus Fett erlaubt. Der Weg führt allem Anschein nach auch über die Milchsäure.

Über den aus normalem Menschenharn durch Behandlung mit p-Dimethylaminobenzaldehyd rein darstellbaren roten Farbstoff.

Von

Georg Scheff.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der k. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 10. März 1925.)

Es ist bereits seit längerer Zeit bekannt, daß manche Harne, die die *Ehrlich*sche rote Aldehydreaktion, zimmerwarm untersucht, nicht geben, sich schön rot färben, wenn man sie erwärmt und nun mit dem Reagens versetzt. Seit den Untersuchungen von *Hári*[1]) steht es fest, daß der rote Farbstoff, den man in der Wärme erhält, verschieden ist von demjenigen, der in manchen pathologischen Harnen bereits bei Zimmertemperatur entsteht. Auch ist es *Hári* gelungen, ersteren aus jedem normalen Harn kristallisiert rein darzustellen, und an diesem reinen Präparat Schmelzpunkt, Löslichkeitsverhältnisse in organischen Solventien, Lichtextinktion der alkoholischen Lösung festzustellen; hingegen war es bei der geringen Ausbeute (2 bis 6 mg pro Liter Harn) bisher nicht möglich, den Farbstoff in solchen Mengen darzustellen, die zu einer eingehenden Strukturanalyse nötig sind. Vor einiger Zeit wurde *Hári* von einem Fachkollegen darauf aufmerksam gemacht, daß gewisse Verunreinigungen des Ammoniaks, das bei der Darstellung des Farbstoffs verwendet wird, mit dem *Ehrlich*schen Dimethylaminobenzaldehyd ebenfalls einen roten kristallisierbaren Körper bilden, daher der von *Hári* dargestellte Farbstoff wohl ein Kondensationsprodukt des Aldehyds ist, doch möglicherweise mit irgend einem Bestandteil des zugesetzten Ammoniaks und nicht mit einem normalen Harnbestandteil.

Um diesbezüglich Klarheit zu erlangen, sollte ein Verfahren ausgearbeitet werden, das außer dem Aldehyd nichts mit dem von *Hári* empfohlenen Verfahren gemein hat; denn, wenn man denselben Körper auch auf diesem anderen Wege erhalten kann, so ist unwiderlegbar

---

[1]) *Paul Hári*, diese Zeitschr. **117**, 41, 1921.

erwiesen, daß es sich wirklich um ein Kondensationsprodukt mit einem normalen Harnbestandteil handelt.

Ursprüngliches Verfahren.

Nach der ursprünglichen Vorschrift wird der auf $^1/_5$ bis $^1/_{10}$ Volumen eingedickte Harn portionsweise mit so viel essigsaurem Blei (in 10- bis 20proz. Lösung) versetzt, bis im Filtrat einer herausgenommenen Probe auf Zusatz von Ammoniak eine stärkere Trübung (kein Niederschlag) entsteht. Nun wird die ganze Flüssigkeit filtriert, das Filtrat bis nahe zum Sieden erhitzt, so lange mit dem Aldehydreagens versetzt, bis die Flüssigkeit, die sich bereits nach dem ersten Zusatz dunkel rotbraun färbt, nicht noch dunkler wird, sodann rasch abgekühlt, portionsweise mit so viel Ammoniak versetzt, bis man in ihr mittels einer Lupe das Auftreten eines rostbraunen Niederschlages entstehen sieht. Nun läßt man einige Minuten lang absitzen, saugt auf einem Nutschenfilter ab, extrahiert den mit Wasser gewaschenen Niederschlag einfach durch Übergießen mit Alkohol, versetzt den Auszug bis zur beginnenden Trübung mit Wasser und läßt stehen. In wenigen, bis 24 Stunden fällt der Farbstoff in haarbüschelförmig angeordneten mikroskopischen Kristallen aus.

Neues Verfahren.

Das von mir geübte Verfahren besteht hingegen in folgendem. Der auf ein Dritteil eingedampfte Harn wird bei Zimmertemperatur mit so viel Tierkohle (*Merck*) geschüttelt, daß das erwärmte Filtrat einer kleinen Probe mit der Aldehydlösung sich nicht mehr rot färbt; man läßt 2 bis 3 Stunden lang stehen, filtriert durch ein mit Wasser befeuchtetes Filter, läßt ganz abtropfen, gießt etwa 5 ccm Alkohol nach, um das restliche Wasser zu entfernen, schwemmt die Kohle in Alkohol auf, erhitzt am Wasserbade bis zum Sieden und filtriert. Diese Extraktion wird einigemal wiederholt, bis vom Alkohol ungefähr so viel verbraucht wurde, als das ursprüngliche Volumen des Harns betrug, dann dampft man die vereinigten Filtrate am Wasserbade bis zur Sirupkonsistenz ein, löst die braune Masse in wenig Alkohol, filtriert von ausgeschiedenen Harzen ab, erwärmt und versetzt mit so viel vom Aldehydreagens, bis die Lösung nicht mehr dunkler wird, und läßt $^3/_4$ Stunden lang stehen. Man notiert das Volumen der verbrauchten Aldehydlösung. Vorausgehend bereitet man sich eine Lösung von Na_2CO_3, deren Konzentration so gewählt ist, daß 1 Volumen des Aldehydreagens durch genau 2 Volumina der alkalischen Lösung neutralisiert wird. Von der alkalischen Lösung läßt man nun 1 bis 2 Tropfen weniger zum dunkel braunroten alkoholischen Extrakt hinzufließen, als laut Berechnung zur Neutralisation nötig ist, worauf man bemerken kann, daß die Farbe von dunkel Braunrot in dunkel

Weinrot umschlägt. Verdünnt man diese Flüssigkeit bis zur beginnenden Trübung mit destilliertem Wasser (ungefähr $^2/_3$ Volumen), so scheiden sich nach einiger Zeit Kristalle von denselben Eigenschaften aus, wie die von *Hári* beschriebenen.

Als besonders charakteristisch wird von *Hári* angegeben, daß die alkoholische Lösung durch einen Absorptionsstreifen mit dem Maximum bei 507 $\mu\mu$ ausgezeichnet ist: in der Lösung der nach meinem Verfahren dargestellten Kristalle befindet sich das Maximum an der nämlichen Stelle. Nachdem in dem von mir oben geschilderten Verfahren weder essigsaures Blei, noch aber Ammoniak verwendet wird, sondern Alkohol, Tierkohle und Na_2CO_3, die mit dem Aldehydreagens auch in der Wärme keine rote Farbenreaktion geben, ist es erwiesen, daß *der von Hári dargestellte kristallisierbare Farbstoff tatsächlich ein Kondensationsprodukt des p-Dimethylaminobenzaldehyds mit einem normalen Harnbestandteil und nicht mit irgend einer Verunreinigung der verwendeten Reagenzien ist.*

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Prof. *P. Hári* ausgeführt.

Quantitative Bestimmung des aus normalem Menschenharn durch Behandlung mit p-Dimethylaminobenzaldehyd erzeugten roten Farbstoffes in der 24stündigen Harnmenge.

Von

Georg Scheff.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut der k. ungar. Universität Budapest.)

(Eingegangen am 10. März 1925.)

Da der von *Hári*[1]) aus jedem normalen Harne durch Behandlung mit dem *Ehrlich*schen Reagens (p-Dimethylaminobenzaldehyd in salzsaurer Lösung) in der Wärme darstellbare Farbstoff, ein Kondensationsprodukt zwischen dem Aldehyd und einem normalen Harnbestandteil, seiner Struktur nach zurzeit noch unbekannt ist, könnte es als verfrüht erscheinen, feststellen zu wollen, wieviel Farbstoff aus der 24stündigen Harnmenge dargestellt werden kann.

Da jedoch die Darstellung einer größeren Menge des Farbstoffs, die es erst ermöglichen wird, über seine Struktur, namentlich aber über die Natur der betreffenden Harnkomponente näheres zu erfahren, in unserem Institut zurzeit bereits im Gange ist, hat es sich als zweckmäßig erwiesen, unterdessen schon eine quantitative Methode auszuarbeiten, mittels deren etwaige Zusammenhänge zwischen Menge und Art der aufgenommenen Nahrung oder anderen Lebensumständen einerseits, und der Ausbeute am roten Kondensationsprodukt andererseits aufgedeckt werden könnten.

Die Isolierung des Farbstoffs in kristallisiertem Zustand, wie sie seinerzeit von *Hári* oder in der vorangehenden Mitteilung von mir[2]) angegeben wurde, ist viel zu verlustreich, um hierauf eine gravimetrische Methode zu basieren. Man kann aber zum Ziele kommen, wenn man den roten Farbstoff in einem geringen Anteil der 24stündigen Harn-

[1]) *Paul Hári*, diese Zeitschr. **117**, 41, 1921.
[2]) *Georg Scheff*, **158**, 167, 1925.

menge entstehen läßt und in dieser Flüssigkeit den Farbstoff, ohne ihn zu isolieren, spektrophotometrisch bestimmt.

Um auf diese Weise richtige Ergebnisse zu erlangen, muß man auf folgende Umstände bedacht sein. Da die Ausbeute an rotem Farbstoff je nach der Konzentration der Salzsäure im verwendeten Reagens, je nach der Temperatur, bei der die Reaktion erfolgt, und auch je nach dem Grade der Neutralisation verschieden sein kann, muß man, um vergleichbare Resultate zu erhalten, stets genau dieselben Versuchsbedingungen einhalten. Außerdem muß auch der Umstand berücksichtigt werden, daß jeder Harn, wenn er mit starker Salzsäure allein, also ohne Aldehyd, erwärmt wird, eine dunklere Farbe annimmt, daher in gewissen Spektralgebieten das Licht stärker absorbiert.

Endlich hat es sich gezeigt, daß der Farbenton des roten Kondensationsprodukts, wenn es in der oben beschriebenen Weise in der wässerigen Lösung entsteht, auch mit bloßem Auge betrachtet, verhältnismäßig rasch abblaßt; hingegen viel beständiger ist und sich während der Dauer der spektrophotometrischen Prüfung nicht nachweislich verändert, wenn sich der ganze Vorgang in einem alkoholischen Medium abspielt. Allen diesen Umständen wurde durch Einhaltung folgender Vorschrift Rechnung getragen: Es werden zwei Eprouvetten mit je 3 ccm Harn beschickt, gleich tief in ein siedendes Wasserbad versenkt, nach einer Minute, die zur Erwärmung der Flüssigkeit und der darüber befindlichen Luft genügt, mit je einem Korkstopfen verschlossen. Am Ende der fünften Minute wird die eine Probe (a) sofort mit 0,5 ccm des Aldehydreagens (2proz. Lösung von p-Dimethylaminobenzaldehyd in einer genau 25proz. Salzsäure), die andere (b) mit 0,5 ccm reiner Salzsäure von genau derselben Konzentration versetzt. Eine Minute später, also am Ende der sechsten Minute, werden beide Proben aus dem Wasserbade gehoben, je nachdem a mehr oder weniger dunkel geworden ist, mit dem 7- bis 2,5fachen Volumen Alkohol aus einer Bürette versetzt, umgeschwenkt, unter einem Wasserstrahl auf etwa 20 bis 30° C abgekühlt und aus einer anderen Bürette mit genau 1 ccm einer Lösung von Na_2CO_3 versetzt. Die Konzentration dieser Lösung ist so gewählt, daß durch 1,05 ccm derselben 0,5 ccm der salzsauren Aldehydlösung neutralisiert werden; hat man also, wie vorgeschrieben, 1 ccm hinzugefügt, so behält der Harn eine Spur seiner sauren Reaktion, was unbedingt nötig ist, da durch einen Alkaliüberschuß der rote Farbstoff unwiderbringlich zerstört würde. Nun mischt man durch Umschwenken, hält aber dabei, um einen Verlust infolge des Aufschäumens der Flüssigkeit hintanzuhalten, die Eprouvette verschlossen und kann die blaßrote, völlig klare Flüssigkeit sofort der spektrophotometrischen Prüfung unterziehen, meistens ohne weiter verdünnen zu müssen. Die geringe Flüssigkeitsmenge, mit der man beim Ein-

halten der obigen Vorschrift arbeitet, reicht meistens nicht hin, um mit ihr die Beobachtungsröhren des modifizierten *König*schen Apparates (mit der großen Beleuchtungsvorrichtung) zu füllen, wohl aber für den kleinen Trog, der den *Schulz*schen Körper enthält. Ich bediente mich bei meinen Untersuchungen des von *Hári*[1]) seinerzeit justierten und kalibrierten alten *König*schen Spektrophotometers.

Da der spezifische Extinktionskoeffizient der alkoholischen Lösung des rein dargestellten Farbstoffs von *Hári* an zahlreichen Stellen des sichtbaren Spektrums festgestellt wurde, steht es einem eigentlich frei, die spektrophotometrische Ablesung an welcher immer der genannten Spektralstellen vorzunehmen, und würde man vorerst annehmen, daß die Stelle der maximalen Absorption, das ist die Stelle 507 $\mu\mu$, die geeignetste sei. Tatsächlich ist es aber das in Grün gelegene Spektralgebiet, in dem unser Auge die maximale Empfindlichkeit für minimale Unterschiede in der Lichtintensität zweier Gesichtsfeldhälften aufweist, was schon *Hüfner* veranlaßt hatte, seine klassischen Bestimmungen an den Blutfarbstoffen in diesem Gebiet vorzunehmen. Als solches wählte ich die Stelle 532,2 $\mu\mu$, richtiger das durch den Okularspalt begrenzte, zwischen 535,9 und 528,4 $\mu\mu$ gelegene Spektralgebiet; was eigens hervorgehoben werden muß, da meine Beobachtungen nicht bei homogenen, sondern bei gemischtem Lichte ausgeführt wurden. Den Ablesungen im Harne läßt man solche am Lösungsmittel an derselben Spektralstelle folgen, wobei unter Lösungsmittel in diesem Falle ein Gemisch zu verstehen ist, das aus Wasser, Aldehydreagens, Alkohol und kohlensaurem Natrium in genau demselben Verhältnis besteht wie die Harnprobe. Beträgt der am Harne abgelesene Winkel β, der am Lösungsmittel abgelesene Winkel α, so ist am alten *König*schen Apparat der Extinktionskoeffizient ε_1

$$\varepsilon_1 = \log \operatorname{tg}^2 \alpha - \log \operatorname{tg}^2 \beta .$$

In diesem Werte ε_1 ist aber auch die Lichtextinktion des Farbstoffs enthalten, der im Harne unter der Einwirkung der starken Salzsäure auch ohne Mitwirkung des Aldehyds entsteht. Um diese Lichtabsorption zahlenmäßig bewerten zu können, muß eben die zweite Probe mit Salzsäure, ohne Aldehydreagens, aufgestellt werden. Sie wird sonst genau so wie die mit Aldehyd versetzte behandelt, spektrophotometrisch geprüft und der an ihr erhobene Wert ε_2 von ε_1 abgezogen. An diesem Werte $\varepsilon_1 - \varepsilon_2$ muß aber noch eine Korrektion angebracht werden für die Volumveränderung, die die 3 ccm des Harnes bei den Verdünnungen mit 0,5 ccm des Aldehydreagens, mit „a“ ccm Alkohol und mit 1 ccm der kohlensauren Alkalilösung erfahren hat. Da 3 ccm des Harnes

[1]) *P. Hári*, diese Zeitschr. 82, 229, 1917.

auf $3 + 0{,}5 + a + 1$ ccm verdünnt wurden, beträgt der Extinktionskoeffizient des unverdünnten Harnes nicht $\varepsilon_1 - \varepsilon_2$, sondern

$$\frac{(3 + 0{,}5 + a + 1)}{3}(\varepsilon_1 + \varepsilon_2).$$

Aus dem so richtig gestellten Extinktionskoeffizienten kann der Farbstoffgehalt des Harnes berechnet werden, wenn das Absorptionsverhältnis A (*Vierordt*) des Farbstoffs an der betreffenden Spektralstelle bekannt ist. Dieses läßt sich aber ohne weiteres auf Grund der von *Hári* ermittelten spezifischen Extinktionskoeffizienten ermitteln. Bekanntlich ist

$$c = \varepsilon \,.\, A, \quad \text{und hieraus} \quad A = \frac{c}{\varepsilon}$$

wo mit c der in Grammen ausgedrückte Farbstoffgehalt von 1 ccm der Farbstofflösung gemeint ist, daher c gleich ist dem hundertsten Teil der prozentischen Konzentration. Der von *Hári* für die Spektralstelle 532,2 $\mu\mu$ ermittelte spezifische Extinktionskoeffizient, d. h. der Extinktionskoeffizient einer 0,1 proz. Lösung des Farbstoffs, hat den Wert 63,8; daher

$$A = \frac{0{,}1}{100\,.\,63{,}8} = 0{,}00001567.$$

Im Besitz des Wertes $A = 0{,}00001567$ läßt sich aus dem Extinktionskoeffizienten des Harnes zunächst seine Farbstoffkonzentration c (im oben definierten Sinne)

$$c = \frac{(3 + 0{,}5 + a + 1)}{3} \cdot (\varepsilon_1 - \varepsilon_2)\,.\,0{,}00001567$$

und hieraus die prozentuale Konzentration gleich

$$100\,\frac{(3 + 0{,}5 + a + 1)}{3}\,(\varepsilon_1 - \varepsilon_2)\,.\,0{,}00001567$$

ermitteln.

Nachstehend seien in Tabelle I beispielsweise die Daten zweier spektrophotometrischer Bestimmungen angeführt. Aus den Daten von Harn I ist zu ersehen, daß die Stelle der maximalen Lichtabsorption in dem nach meiner Vorschrift behandelten Harne annähernd genau an derselben Spektralstelle (bei 508 $\mu\mu$) gelegen ist, wie nach *Hári* in der alkoholischen Lösung des rein dargestellten Farbstoffs (bei 507 $\mu\mu$). An Harn II wurde die spektrophotometrische Ablesung bloß an der Spektralstelle 532,2 $\mu\mu$ ausgeführt, die ich später in jedem Harne verwendete. An dieser Stelle wurde auch die Ablesung an einer zweiten Probe desselben Harnes ausgeführt, die mit Salzsäure allein, ohne Aldehydzusatz, erwärmt wurde. Der an der Salzsäureprobe ermittelte, vom Hauptwert abzuziehende Extinktionskoeffizient beträgt etwa 25 Proz. des Hauptwertes.

Tabelle I.

Spektralstelle	Extinktionskoeffizienten		
	Harn I	Harn II	
μμ	mit Aldehydreagens erwärmt	mit Aldehydreagens erwärmt	mit HCl allein erwärmt
535,1	0,770	—	—
532,2	—	0,782	0,202
527,3	0,935	—	—
521,3	1,058	—	—
514,6	1,111	—	—
508,0	1,185	—	—
504,8	1,172	—	—
501,6	1,147	—	—
495,3	1,052	—	—
489,2	0,940	—	—

In einer etwa 1 Monat dauernden Selbstversuchsreihe, während welcher Zeit viermal je ein Tag, einmal eine ganze Woche ausfiel, habe ich in je einer Probe des täglich gesammelten Harnes nach der oben beschriebenen Methode die Konzentration des mit dem *Ehrlich*schen Aldehydreagens darstellbaren roten Farbstoffs bestimmt. Die Daten dieser Versuche sind in nachstehender Tabelle II zusammengestellt. Im vorletzten Stabe derselben ist die Menge des Farbstoffs verzeichnet, die aus der 24stündigen Harnmenge und der Konzentration am Farbstoff berechnet wurde.

Da der Harn täglich vom Morgen des betreffenden Versuchstages bis zum nächsten Morgen gesammelt wurde, enthält er stets auch den Nachtharn, und in diesem offenbar den größten Teil der Zersetzungsprodukte, die aus der am Abend genossenen Nahrung entstanden sind. In dieser zunächst bloß orientierenden Versuchsreihe wurde das Gewicht der je eine Mahlzeit bildenden Fleisch- oder anderen Speisen nicht bestimmt, sondern in den Versuchsprotokollen bloß vermerkt, ob z. B. am betreffenden Tage Fleisch überhaupt, oder wenig, oder viel Fleisch genossen wurde; desgleichen auch, wenn am betreffenden Tage eine spezielle Diät befolgt wurde. Die hierauf bezüglichen Daten sind abgekürzt im letzten Stabe der Tabelle enthalten. Aus Tabelle II ist zu ersehen, daß

1. bei gemischter Nahrung, die mäßige Mengen von Fleisch enthielt, aus dem Harne von 24 Stunden etwa 45 bis 60 mg Farbstoff dargestellt werden können;

2. nach Genuß von viel Fleisch weit mehr, etwa 75 bis 90 mg;

3. nach einer Zugabe von viel Topfen (Quark) bis zu 70 mg;

4. bei fleischloser Ernährung weit weniger, etwa 35 mg.

Tabelle II.

Datum 1924	Tages-Harnmenge cm	Konzentration des Farbstoffes Proz.	Gesamtmenge des Farbstoffes g	Tagsüber eingeführt nebst Suppe, Gemüse und Brot
20. III.	1370	0,0066	**0,091**	2 Fleischspeisen + 50 g Wurst
21. III.	870	0,0071	0,062	2 "
22. III.	860	0,0061	0,052	1 " + 30 g Wurst
23. III.	745	0,0071	0,053	?
24. III.	940	0,0082	**0,078**	4 Fleischspeisen
25. III.	1035	0,0033	**0,035**	Dyspepsie: Rindssuppe und 1 Ei; kein Gemüse, kein Fleisch
27. III.	960	0,0062	0,060	1 Fleischspeise + 30 g Wurst
28. III.	825	0,0043	**0,036**	} 300 g Brot + 50 g Butter + 600 g Kartoffel (kein Fleisch!)
29. III.	1065	0,0032	**0,035**	
30. III.	870	0,0033	0,029	} 300 g Holländer-Käse, viel Brot (kein Fleisch!)
31. III.	880	0,0065	0,057	
1. IV.	1080	0,0053	0,058	2 Fleischspeisen
2. IV.	990	0,0058	0,058	2 "
3. IV.	895	0,0057	0,051	2 "
10. IV.	1140	0,0067	**0,077**	2 " (weit größere Rationen als sonst)
11. IV.	1130	0,0047	0,055	2 "
12. IV.	820	0,0054	0,045	1 "
14. IV.	790	0,0057	0,046	2 "
16. IV.	1360	0,0034	0,047	2 " + 250 g Quark (Topfen)
17. IV.	1370	0,0050	**0,070**	2 " + 250 g " "
18. IV.	1050	0,0050	0,054	2 "

Es ist daher mit großer Wahrscheinlichkeit anzunehmen, daß *der normale Harnbestandteil, der mit dem Ehrlichschen Aldehydreagens in der Wärme das rote Kondensationsprodukt liefert, ein Eiweißabkömmling ist und namentlich aus Fleisch in größeren Mengen abgespalten wird.*

Diese Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Prof. *P. Hári* ausgeführt.

Zur Methodik der chemischen Blutanalyse.

Von

Marianne Richter-Quittner.

(Aus dem chemischen Laboratorium des serotherapeutischen Instituts in Wien.)

(Eingegangen am 11. März 1925.)

Erst seit verhältnismäßig kurzer Zeit besitzen wir eine *genaue* Kenntnis der chemischen Zusammensetzung des Blutes. Die Erforschung des Chemismus des Blutes unter physiologischen und pathologischen Verhältnissen ist das Resultat jahrelanger mühevoller Forscherarbeit von seiten der Biologen, Chemiker und Kliniker. In dieser Hinsicht sind wir den deutschen und amerikanischen Untersuchern zu großem Danke verpflichtet, welche uns außerordentlich wertvolle Data in die Hand gaben (*Hoeber*, *Loeb*, *Folin*, *Wu*, *Schade*, *van Slyke*, *Bechhold*, *v. Koranyi*, *Benedict* u. a. m.).

Zweck nachstehender Versuche ist es, zu zeigen, daß eine chemische Blutuntersuchung nur dann Aussicht auf Erfolg hat, wenn sie von *chemischen und biologischen* Gesichtspunkten aus richtig ist.

I. Methodik.

Die Blutabnahme und die Gewinnung von Plasma und Serum.

Um brauchbare Vergleichswerte zu erhalten, ist es notwendig, das Blut früh nüchtern zu entnehmen. Die Versuchstiere läßt man am besten 24 Stunden vor jeder Blutabnahme hungern. Beim Menschen wurde das Blut unter leichter Stauung aus der Cubitalvene entnommen. Genügen einige Kubikzentimeter, so ist arterialisiertes Kapillarblut aus der Fingerbeere vorzüglich geeignet. Beim Kaninchen erfolgte die Blutabnahme entweder aus dem Ohre (bis zu 30 ccm) oder ohne Narkose aus der Carotis.

Zwecks Ungerinnbarmachung des Blutes eignet sich für viele Untersuchungen ausschließlich das *Hirudin*, welches wir nach dem Verfahren von *Heykraft* aus Blutegeln darstellen. Gewöhnlich genügen 30 bis 50 mg Hirudin, um 100 ccm Blut ungerinnbar zu machen. Unserer

Ansicht nach ist das Hirudin unentbehrlich für die Bestimmung des Calciums (Plasma und Ultrafiltrat). Die übrigen Mineralanalysen können auch im Serum ausgeführt werden, doch ziehen wir das Hirudinplasma dem Serum vor.

Der Calciumgehalt des Hirudinplasmas ist ausnahmslos etwas höher als der des dazugehörigen Serums, wie folgende Beispiele zeigen sollen:

Bezeichnung	Ca im Plasma mg-Proz.	Ca im Serum mg-Proz.
Kaninchen	10,2	9,4
Pferd	9,8	9,0
Rind	9,6	9,0
Gesunder Mensch . .	9,6	9,0
Diabetes mell.	9,2	8,9

Diese Differenzen sind, wie ersichtlich, außerordentlich klein und könnten praktisch vernachlässigt werden. Da aber bis heute keine Mitteilungen vorliegen, ob nicht unter *experimentellen* und *pathologischen* Bedingungen der Calciumgehalt des Serums wesentlich von dem des Plasmas abweicht, muß die Forderung erhoben werden, *für Blutkalkbestimmungen ausschließlich das Hirudinplasma zu verwenden.* Aus denselben Gründen ist das Hirudinplasma dem Serum vorzuziehen, wenn es sich darum handelt, Mineralanalysen in *Ultrafiltraten* auszuführen.

Für die Bestimmung des *Blutzuckers* muß nach den Untersuchungen maßgebender Autoren (*Ambard, Blum, Etienne* und *Vérain, Folin, Schmid, Wu* u. a. m.) das Blut mit *Natriumfluorid* ungerinnbar gemacht werden, um die Blutkörperchen zu hämolysieren und gleichzeitig die Glykolyse zu hemmen.

Verwendete Wagen.

In der analytischen Chemie sind heute drei verschiedene Typen von Wagen in Gebrauch; die feine Analysenwage (deutsches Fabrikat), die *Kuhlmann*sche Mikrowage und die aperiodischen Wagen von *Longue* in Paris. Es gibt *aperiodische Wagen* mit Öl und solche mit Luftdämpfung. Neben den aperiodischen Makrowagen, mit welchen man auf vier Dezimalen von Gramm genau wägen kann, werden seit kurzem in Paris aperiodische Mikrowagen gebaut. Die aperiodische Mikrowage wurde auf Wunsch von *Bertrand, Nicleoux, Mestrezat* und *Javillier* vom Ing. *Longue* konstruiert, welcher sich hierbei auf die Arbeiten von Mme. *Curie* und *Collot* stützte. Das Prinzip dieser Wagen ist folgendes: Bei den aperiodischen Wagen mit Luftdämpfung wird die Dämpfung der Schwingungen dadurch erreicht, daß die Luft mit Hilfe einer Glocke aus Aluminium, welche unter jeder Wagschale angebracht ist, kom-

primiert wird. Das Gleichgewicht der Wage wird durch folgende Gleichung ausgedrückt:

$$\tang \alpha = \frac{p\,l}{\pi\,d},$$

wobei a den Winkel der Inklination des Wagebalkens, p das Übergewicht auf eine der Schalen, l den Abstand der mittleren Schneiden von den äußeren Schneiden, π das Gewicht der Wagschale und d den Abstand des Unterstützungspunktes vom Schwerpunkt bedeutet. Das Übergewicht ist also der Tangente der Deviation proportional. Daher gibt die Stellung der Mikrometerskala in Verbindung mit dem Faden des Fadenkreuzes mittels einer einfachen Ablesung die Deviation. d. h. die Größe des Übergewichts an. Mit Hilfe einer einzigen Ablesung ist es möglich, die Milligramme bis auf drei Dezimalen genau abzulesen. Es ist einleuchtend, daß diese Wagen, mit welchen man eine Wägung (makro- oder mikroanalytisch) in wenigen Sekunden ausführen kann, unseren deutschen Wagen überlegen sind. Ich hatte in Straßburg Gelegenheit, mit diesen Wagen zu arbeiten, und kann sie wärmstens empfehlen.

Zum *Filtrieren von Niederschlägen*, welche dann gewogen werden, verwenden wir die *Pregl-Filterröhrchen*. Das Röhrchen wird auf eine Saugflasche montiert, mit Asbest gefüllt und mit Schwefelchromsäure, Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Diese Filterröhrchen leisteten uns für die Bestimmung des Natriums, Kaliums, Magnesiums, Phosphors und Cholesterins ausgezeichnete Dienste.

Enteiweißungsmethoden.

Zwecks vollständiger Entfernung der Eiweißkörper stehen uns drei prinzipiell verschiedene Methoden zur Verfügung, welche auch vom biologischen Standpunkt aus nicht gleichwertig sind:

1. die Veraschung,
2. die Fällung der Eiweißkörper,
3. die Ultrafiltration.

Die *Veraschungsmethoden* können nur dort angewendet werden, wenn es sich darum handelt, bei Mineralanalysen des Blutes die *absoluten* Werte zu ermitteln, ohne Rücksichtnahme, in welcher Form die Mineralien vorhanden sind. So kann ich die Veraschung auf nassem Wege mit Salpetersäure für die Bestimmung des Chlors, mit Salpetersäure und Schwefelsäure für die Bestimmung des Gesamtphosphors bestens empfehlen, während sich die Veraschung auf trockenem Wege ohne jeglichen Zusatz für die Bestimmung von Natrium, Kalium,

Calcium und Magnesium eignet. Für die Bestimmung der Alkalien und Erdalkalien sind Platingeräte unerläßlich.

Die *Fällungsmittel für Eiweißkörper* sind außerordentlich zahlreich. Für die Bestimmung des Blutzuckers eignet sich die Fällung mit Quecksilbersalzen und Natriumwolframat nach der Vorschrift von *Folin* und *Wu*. Für die Bestimmung des Reststickstoffs ist neben der Ultrafiltration 10proz. Trichloressigsäure sehr geeignet. Eiweißfällungsmittel, welche Harnstoff adsorbieren, wie z. B. die Schwermetalle und Schwermetallsalze, können naturgemäß nicht verwendet werden.

Ein weites Anwendungsgebiet findet die *Ultrafiltrationsmethode* in der Blutanalytik. Mit Hilfe der Ultrafiltration ist es nicht nur möglich, die Eiweißkörper von ihrem Suspensionsmittel quantitativ zu trennen, sondern auch zu bestimmen, in welcher *Form* (d. h. ob echt gelöst oder kolloidal gebunden) die einzelnen Substanzen im Blute kreisen.

Gegenwärtig sind drei verschiedene Ultrafiltrationsapparate in Gebrauch: der Apparat von *Bechhold*, der von *Zsigmondy* und der von *Giemsa*. Nur der letztgenannte ist nach unseren Erfahrungen für Blutanalysen geeignet. Der Apparat von *Giemsa* hat nämlich gegenüber den anderen Ultrafiltrationsapparaten den Vorteil, daß man das Plasma nicht verdünnen muß und mit kleinen Mengen (10 bis 15 ccm) das Auslaugen erreichen kann. Auch ist dieser Apparat viel einfacher und daher billiger als alle übrigen Ultrafiltrationsapparate. Der Apparat besteht aus einer Saugflasche, die einen doppelt durchbohrten Gummistöpsel trägt. Durch die eine Bohrung wird ein kapillares Glasrohr geführt, das in ein Reagenzglas hininreicht. Dieses Reagenzglas von 20 ccm Fassungsraum dient dazu, das Ultrafiltrat aufzufangen. Die andere Öffnung des rechtwinklig gebogenen Glasrohrs trägt einen kleinen Gummistöpsel, an welchem das Ultrafiltrationsröhrchen befestigt wird. Dieses taucht man in das zu ultrafiltrierende Plasma ein. Die zweite Bohrung des Gummistöpsels trägt ein kapillares Glasrohr mit Glashahn, an welchem eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen wird. Das Ansatzrohr der Saugflasche wird mit einem Glasrohr verbunden, das in ein Schälchen mit Quecksilber eintaucht und als Manometer dient. Um jede Verdunstung während der Ultrafiltration, welche gewöhnlich mehrere Stunden Zeit in Anspruch nimmt, zu vermeiden, wird das Plasma mit Paraffin überschichtet und einige Kubikzentimeter Wasser in die Saugflasche gegeben. Die Ultrafilter werden aus Eisessigkollodium hergestellt. Man stülpt die Papierhülse über den siebartig durchlochten Porzellanzylinder und taucht das Röhrchen in eine Lösung von Kollodium in Eisessig ein und härtet die Filter mehrere Tage in Wasser. Vor Gebrauch werden die Filter auf Eiweißundurchlässigkeit mit einer 1proz. Lösung von Hämoglobin und einer 5proz. Lösung von Pepton geprüft. Die Ultrafiltrate dürfen weder mit Trichloressigsäure

noch mit Sulfosalicylsäure eine Eiweißreaktion geben. Die eigentliche Ultrafiltration wird folgendermaßen ausgeführt:

10 bis 30 ccm Hirudinplasma werden in einen Meßzylinder hinein gemessen (genaue Messung mittels Pipette) und mit Paraffinöl überschichtet. Man ultrafiltriert bei einem Quecksilberdruck von etwa 150 mm so lange, bis etwa die Hälfte des Plasma ultrafiltriert ist. Die Ultrafiltration von 5 ccm nimmt gewöhnlich 1 bis 2 Stunden Zeit in Anspruch. Das Ultrafiltrat wird nun wieder möglichst genau gemessen, und die Bestimmungen werden im ursprünglichen Plasma, im Ultrafiltrat und im Ultrafiltrationsrückstand ausgeführt. Auf diese Weise hat man die beste Kontrolle dafür, daß die Ultrafiltration und die Analysen richtig ausgeführt wurden. In Übereinstimmung mit *Hirth* und *Tschiember* konnte ich zeigen, daß die einzelnen Portionen des Ultrafiltrats identische Werte geben.

Ich gebe hier einige Beispiele an:

Calciumbestimmung im Menschenplasma.

	Plasma	Ultrafilter 1	Ultrafilter 2	Ultrafilter 3	Rückstand
Ca, mg-Proz.	9,6	4,8	4,9	4,8	16,6
Menge, ccm	25	5	5	5	10
Ca. mg-Proz.	10	5	4,9	4,9	16,5
Menge, ccm	25	5	5	5	9,8
Ca, mg-Proz.	9,6	4,7	4,7	4,9	16,0
Menge, ccm	26	5	5	5	11
Natriumbestimmungen im menschlichen Serum.					
Na, mg-Proz.	340	340	340	345	346
Menge, ccm	30	5	6	8	11
Na, mg-Proz.	336	340	340	335	340
Menge, ccm	15	2	2	2	7

Der Ultrafiltrationsmethode kommt also in der Blutanalytik eine doppelte Bedeutung zu:

1. als Enteiweißungsmittel, vor allem für die Bestimmung der Harnsäure;

2. zur Ermittlung des physikalischen Zustands der im Blute vorhandenen Substanzen.

Wir konnten mit Hilfe der Ultrafiltrationsmethode zeigen, daß normalerweise der ganze im Blute kreisende Zucker frei gelöst ist, ferner die Natron-, Kalisalze und die Chloride, während ein Teil des Blutkalks und des Magnesiums kolloidal gebunden ist. Unter pathologischen Verhältnissen kann das physikalische Verhalten der Plasmasalze weitgehend geändert sein. Auf diese Befunde werden wir an anderer Stelle ausführlich eingehen. Ebenso ist es möglich, wie ich

bereits mitgeteilt habe, auf experimentellem Wege das Verhältnis von freiem zu gebundenem Calcium zu beeinflussen.

Die Bestimmung der Konzentration erfolgt mit Hilfe der Trockenrückstandbestimmung in 1 ccm Plasma oder Serum in der gleichen Weise, wie ich sie in früheren Arbeiten angegeben habe.

Die Bestimmung des Blutzuckers.

Für die Bestimmung des Blutzuckers scheint mir die Mikromethode von *Fontès Thivolle* am besten geeignet zu sein.

Da diese Methode bei uns nur wenig bekannt ist, möchte ich sie hier in Kürze mitteilen.

Das Prinzip dieser Methode, welche es gestattet, Zuckermengen von 0,01 bis 1 mg zu bestimmen, ist das Folgende:

Wenn man zu einem Niederschlag von Cu_2O (in feiner Suspension) eine farblose, stark saure Lösung von MoO_3 hinzufügt, so löst sich der Kupferniederschlag auf, während sich gleichzeitig ein intensiv blau gefärbtes Suboxyd des Molybdäns bildet. Fügt man nun Kaliumpermanganat hinzu, so wird das blaue Suboxyd wieder zu farblosen MoO_3 oxydiert. Die Anzahl Kubikzentimeter Kaliumpermanganat, welche zur vollständigen Entfärbung notwendig sind, entsprechen den Zuckermengen.

Enteiweißung nach *Folin* und *Wu* mit Phosphorwolframsäure. 2 ccm des Filtrats werden im Zentrifugenglas mit den *Fehling*schen Lösungen im Wasserbad genau 6 Minuten gekocht und nach dem Erkalten zentrifugiert. Der Kupferniederschlag wird im Phosphormolybdänreagens aufgelöst und mit Kaliumpermanganat auf farblos titriert.

Diese Methode ist einfach und zuverläßlich und gibt die gleichen Werte wie die Methode von *Bertrand*.

Die Bestimmung der Harnsäure.

Den gebräuchlichen Harnsäurebestimmungsmethoden haften, wie schon *Harpuder*, *Mond*, *Griessbach* u. a. m. gezeigt haben, zwei Fehlerquellen an, die die so erhaltenen Werte illusorisch machen.

1. Binden alle Enteiweißungsmittel Harnsäure in beträchtlicher Menge.

2. Ist die Silberfällung der Harnsäure nicht quantitativ.

Die erste Fehlerquelle läßt sich, wie ich schon vor Jahren gezeigt habe, durch *Ultrafiltration* in schwach alkalischer Lösung beheben. Hier leistet der Apparat von *Giemsa* ausgezeichnete Dienste, der es ermöglicht, Ultrafiltrationen vom Serum auszuführen, *ohne das Serum vorher zu verdünnen.*

Auch erweist es sich für den weiteren Gang der Analyse als sehr vorteilhaft, daß jeder störende Zusatz von Säure oder Salzen vermieden wird.

Der Harnsäuregehalt des Plasmas und des Serums ist identisch. Der Harnsäuregehalt des entsprechenden Ultrafiltrats ist immer höher, wie aus nachfolgenden Beispielen hervorgeht:

Bezeichnung	mg-Proz. Harnsäure im		
	Plasma	Serum	Ultrafiltrat
Gesunder Mensch	3,0	3,0	3,8
Gesunder Mensch	2,8	2,6	3,7
Chronische Nephritis, Hypertonie	4,2	—	6,8
Chronische Glomerulonephritis . .	5,2	—	7,6
Lymphatische Leukämie	7,0	6,8	9,0

Bei der Bestimmung der Harnsäure im Plasma oder Serum wurden die Eiweißkörper mit Natriumwolframat nach *Folin* und *Wu* gefällt. An Stelle der Silberfällung der Harnsäure, welche niemals quantitativ ist, verwenden wir die Methode von *Benedict*, welche *Victor Caryl Myers* in seinem Buche angibt. Für die Auswertung der Harnsäure ist nach Ansicht maßgebender Autoren ausschließlich die *kolorimetrische* Methode geeignet.

Die Bestimmung von Calcium und Magnesium.

Für die Bestimmung des Calciums und Magnesiums ist ausschließlich das *Hirudinplasma* geeignet.

Die Mikromethode von *de Waard* liefert nach eigenen Erfahrungen sowie Untersuchungen der Klinik *Blum* in Straßburg i. E. unzuverlässige Werte. Hingegen hat sich uns die Methode von *Jansen* in der Modifikation von *Hirth* für die Bestimmung des Calciums sehr bewährt. Da diese Methode wenig bekannt ist, will ich sie hier in Kürze angeben.

5 ccm *Hirudin*plasma werden in einer *Platinschale* im Wasserbad zur Trockne eingedampft und dann verascht. Die Asche wird am Wasserbad in 2 ccm 4 proz. Salzsäure gelöst und mit doppeltdestilliertem Wasser in ein 50-ccm-Becherglas aus Jenenser Glas übergespült und auf ein Volumen von 15 ccm gebracht. Man setzt 4 Tropfen Eisenchloridlösung und 1 Tropfen Bromwasser zu und kocht auf. Nach dem Erkalten setzt man 1 Tropfen Phenolphthalein zu. Man setzt tropfenweise Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion, dann Essigsäure bis zur sauren Reaktion und noch einen Überschuß von 5 Tropfen zu. Man kocht auf und filtriert durch ein kleines, mit Salzsäure und Wasser sorgfältig gewaschenes Filterchen in eine kleine Glasschale. Der Niederschlag wird mit 10 ccm Wasser, dem man 3 Tropfen Essigsäure und 3 Tropfen Ammoniak zugesetzt hat, ausgewaschen. Das

Filtrat wird auf dem Wasserbad auf ein Volumen von 4 ccm eingedampft. Man setzt 1 ccm saure Oxalsäurelösung und 2 ccm gesättigte Ammonoxalatlösung zu und beläßt eine halbe Stunde auf dem Wasserbad. Nach dem Erkalten macht man mit Ammoniak gerade alkalisch und läßt 4 bis 5 Stunden absetzen. Das ausgefällte Calciumoxalat wird abfiltriert und mit heißer verdünnter Ammonoxalatlösung gewaschen. Im Filtrat kann das Magnesium bestimmt werden. Das Calciumoxalat wird mitsamt dem Filter in einen kleinen Platintiegel verascht und stark geglüht. Nach dem Erkalten wird das gebildete Calciumoxyd in 2 ccm n/40 HCl im Wasserbad aufgelöst. Man spült in einen Quarztiegel über und titriert mit Methylrot als Indikator mit n/100 NaOH das nicht verbrauchte HCl zurück.

Das Filtrat von Calciumoxalat inklusive Waschwasser wird in einer Platinschale im Wasserbad bis zur Staubtrockenheit eingedampft, verascht und der Rückstand in verdünnter Salzsäure gelöst und filtriert. Das Filtrat wird bei neutraler Reaktion (Phenolphthalein) im Glasschälchen im Wasserbad auf 4 ccm eingedampft und mit 1 ccm 1 proz. Ammonphosphatlösung und 2 ccm konzentrierten Ammoniaks versetzt. Man läßt 12 bis 14 Stunden absetzen, filtriert und wäscht mit 2,5 Proz. Ammoniak aus. Der Niederschlag wird in 2,5 ccm gleicher Teile verdünnter Salpetersäure und verdünnter Schwefelsäure aufgelöst und mit heißem Wasser nachgewaschen. Man bringt das Volumen auf 7,5 ccm und fällt in der Hitze mit 7,5 ccm Molybdänreagens (Ammonmolybdat in konzentrierter Salpetersäure). Man läßt mehrere Stunden unter öfterem Umschwenken im Dunkeln stehen. Man filtriert durch ein gewogenes Preglfilter, wäscht mit Ammonnitrat, Alkohol, Aceton und Äther aus und trocknet bis zur Gewichtskonstanz.

Diese Methode liefert sowohl für das Calcium als auch für das Magnesium sehr gute Werte. Die von uns gefundenen Zahlen sind 9,6 mg-Proz. Calcium und 2,5 mg-Proz. Magnesium als Normalwerte für den gesunden erwachsenen Menschen. Werte über 10 und unter 9 mg-Proz. für das Calcium sind als pathologisch zu bezeichnen. Eine Abweichung von der Norm im Sinne einer *Verminderung* findet sich viel häufiger als im Sinne einer *Vermehrung*.

Die Bestimmung von Kalium und Natrium.

Da es uns bisher nicht gelungen ist, mit den in der Literatur angegebenen Mikromethoden brauchbare Werte für das Kalium zu erhalten, bestimmen wir das Kalium nach der altbewährten Methode von *Schoesing* und *Wense* als Perchlorat. Diese Methode ist zuverlässig, hat aber den großen Nachteil, daß für eine einzige Bestimmung 15 bis 20 ccm Organflüssigkeit erforderlich sind. Aus diesem Grunde können bis jetzt manche interessante Fragen der Biochemie keiner Lösung

zugeführt werden, und es wäre daher zu begrüßen, wenn eine verläßliche Mikromethode geschaffen würde.

Die Blutkörperchen enthalten weit mehr Kalium als das sie umgebende Plasma. Es ist daher notwendig, die Blutkörperchen vom Plasma durch Zentrifugieren sofort zu trennen, da sonst nicht unbeträchtliche Mengen von Kalisalzen aus den Blutkörperchen in das Plasma diffundieren und man im Plasma zu hohe Werte erhält.

Der Kaliumgehalt des Plasmas und des Serums ist identisch, die Kalisalze befinden sich unter normalen Verhältnissen vollkommen frei gelöst. Ich gebe hier einige Beispiele an.

Bezeichnung	mg Kalium in 100 ccm			
	Plasma	Serum	Ultrafiltrat	Rückstand
Gesunder Mensch . .	25,6	25,0	25,2	26,0
Hypertonie	—	24,6	25,0	25,0
Diabetes mell. . . .	—	24,0	24,6	25,0
Nephritis	—	24,56	24,9	25,2
Kaninchen	26,2	—	—	—
Rind	—	24,6	24,5	24,0

Für die *Bestimmung des Natriums* kann ich die gravimetrische Methode als Natriumpyroantimonat am meisten empfehlen.

Die Methode gestaltet sich kurz wie folgt:

2 ccm Hirudinplasma oder Serum werden in der Platinschale im Wasserbad zur Trockne eingedampft und dann vorsichtig verascht. indem man die Platinschale in eine Quarzschale stellt. Die Asche wird sechsmal mit destilliertem Wasser, dem man einige Tropfen Salzsäure zusetzt, ausgelaugt und schließlich das Filter mit den Aschenrückständen stark geglüht. Die Asche wird mit verdünnter Salzsäure am Wasserbad gelöst, mit den Filtraten vereinigt und in einem Bechergläschen auf ein Volumen von 15 ccm gebracht. Man scheidet unter Zusatz von Eisenchlorid die Phosphate ab, wie bei der Bestimmung des Calciums angegeben wurde, und dampft das Filtrat auf 2 ccm ein. Man macht mit einigen Tropfen KOH gerade alkalisch, setzt unter beständigem Umrühren 10 ccm des Kaliumpyroantimonatreagens und 2 ccm 95proz. Alkohols zu. Man läßt 1 Stunde absetzen und filtriert durch ein gewogenes Preglröhrchen, wäscht mit 10 ccm 30proz. Alkohols aus und trocknet bis zur Gewichtskonstanz bei 110°. Gewicht des Niederschlags dividiert durch 11,08 gibt das Natrium in Milligrammen.

Diese Methode wurde in neuester Zeit von *Müller* und *Bálint* in der Weise modifiziert, daß sie zwar wie ich das Natrium als Natriumpyroantimonat fällen, aber den Niederschlag nicht wägen, sondern das Antimon maßanalytisch bestimmen. Das Prinzip dieser Methode ist ausgezeichnet, doch erscheint mir die gravimetrische Methode technisch

handlicher zu sein. Unbedingt notwendig ist es, das organische Material vor der Fällung des Natriums durch Veraschung zu entfernen, während die Fällung der Phosphate nach Ansicht vieler Autoren unterbleiben kann. Die Eiweißkörper mittels *Ultrafiltration* zu entfernen, ist deshalb nicht möglich, da es sich vor kurzem herausgestellt hat, daß zwar normalerweise alles Natrium ultrafiltrabel ist, hingegen unter pathologischen Verhältnissen ein Teil der Natronsalze kolloidal gebunden sein kann.

Die Bestimmung des Chlors.

Zwecks Entfernung der Eiweißkörper für die Bestimmung der Chloride ist nur die Veraschung auf nassem Wege mittels Salpetersäure geeignet. Vor kurzem hat *van Slyke* die bekannte Methode von *v. Koranyi* in der Weise modifiziert, daß er an Stelle einer wässerigen Silbernitratlösung eine salpetersaure Silbernitratlösung verwendet. Beide Methoden geben identische Werte.

Die Bestimmung der Kohlensäure.

Zur Bestimmung der Kohlensäure und der Bicarbonatkonzentration wurde die Alkalireserve im Apparat von *van Slyke* ermittelt.

II. Befunde.

Mineraluntersuchungen im Plasma.

Unter Berücksichtigung aller Kautelen, die ich hier angegeben habe, habe ich im Laufe der letzten 2 Jahre eine große Zahl von chemischen Blutanalysen beim gesunden und kranken Menschen und bei verschiedenen Tieren (Kaninchen, Katze, Hund, Pferd, Rind, Kalb, Schwein) durchgeführt. Ich gebe einige Beispiele meiner Untersuchungen, die ich zum Teil im chemischen Laboratorium der medizinischen Klinik *Blum* in Straßburg i. E. ausgeführt habe, in Tabelle I und II wieder. Es ergibt sich, daß der Mineralgehalt von Mensch und Tier unter physiologischen Verhältnissen außerordentlich konstant ist. *Wir finden normalerweise 330 bis 350 mg-Proz. Natrium, 25 mg-Proz. Kalium, 9,2 bis 9,8 mg-Proz. Calcium, 2,5 mg-Proz. Magnesium, 350 mg-Proz. Chlor bei einem Wassergehalt von 90 g-Proz.* Das Kaninchenblut (im ganzen wurden bisher 48 Kaninchen genau untersucht) unterscheidet sich vom Menschenblut dadurch, daß das Calcium etwas höher eingestellt ist und die Alkalireserve bedeutend niedriger. Während wir beim gesunden Menschen für die Alkalireserve Werte von 55 bis 56 ccm CO_2 finden, fanden wir beim Kaninchen bloß 43 bis 45 ccm CO_2.

Unter pathologischen Verhältnissen können Abweichungen von der Norm nach oben und unten beobachtet werden. Auf diese Befunde werden wir an anderer Stelle ausführlich eingehen.

Tabelle I. Mineralgehalt des normalen Kaninchenplasmas.

Datum	Bezeichnung	Gewicht	Futter	H_2O	CO_2	mg in 100 ccm Plasma					mg in 100 ccm Ultrafiltrat		mg in 100 ccm Rückstand		Bemerkungen
		g		g	ccm	Na	K	Ca	Mg	Cl	Na	Ca	Na	Ca	
25.VI.23	Kaninchen A	2200	Gras	—	—	335	25,9	9,9 9,6	2,30 2,34	—	335	—	340	—	Für die Ultrafiltration 10 ccm Plasma = 5 ccm Ultrafiltrat + 5 ccm Rückstand
1924/25 7. IV.	„ R	1850	Gras	—	45,0	342	26,0	9,16 9,10	—	350	—	—	—	—	
30. VI.	„ C	—	Gras	—	44,6	330	—	10,56	—	—	328	5,46 (51 Proz.)	33,01	15,5	Für die Ultrafiltration 20 ccm Plasma = 10 ccm Ultrafiltrat + 9,8 ccm Rückstand
15. XII.	„ 2	2000	Rüben	92,8	45,0	340,6	—	11,4	2,4	350	340	—	345	—	
5. I.	„ 5	3400	Rüben	—	—	340,0	25,0	11,9	2,4	—	—	6,0 (54 Proz.)	—	—	
5. II.	„ 11	2400	Rüben	93,8	—	330,6	—	12,5	2,5	—	—	6,2 (50 Proz.)	—	—	

Tabelle II. Mineralgehalt des Menschenplasmas.

Datum	Diagnose	H_2O	CO_2	Asche	mg-Proz. im Plasma					mg-Proz. Ultrafiltrat		mg-Proz. im Rückstand		Bemerkung
		g	ccm	g	Chlor	Na	K	Ca	Mg	Na	Ca	Na	Ca	
15.VI. 1923	Normal	90,0	56,5	1,07	350,0	340,0	25,2	9,6	2,5	—	—	—	—	
10.VI. 1924	Normal	90,0	55,9	1,09	355,0	335,6	25,0	9,6	2,5	335	5,0 (52 Proz.)	332	14,2	Für die Ultrafiltration 20 ccm Plasma = 10 ccm Ultrafiltrat + 9,9 ccm Rückstand
22.VI. 1923	Nephr. Hypertonie	—	—	—	360,0	330,0	25,9	9,8 9,4	2,5 2,7	—	—	—	—	
26.VI. 1923	Ödematöse Nephr.	91,5	—	—	—	335,6	26,8	10,16 10,36	1,5	301	—	301	—	
7. IV. 1924	Osteomalacie	—	45,8	—	—	—	—	8,63 8,67	—	—	7,28 (84 Proz.)	—	—	
19. XI. 1924	Ekzem	—	53,0	—	—	—	—	12,16	2,0	—	6,66 (55 Proz)	—	—	
29. XII. 24	Urticaria	—	56,0	—	—	—	—	12,40	1,72	—	4,98 (40 Proz.)	—	—	

Normalerweise ist alles Natrium, Kalium und Chlor ultrafiltrabel, während nur etwa 54 Proz. der Calciumsalze das Ultrafilter passieren. Auch die Magnesiumsalze sind nur zum Teil ultrafiltrabel. Es erscheint uns interessant und wichtig, daß sowohl unter experimentellen Bedingungen als auch unter pathologischen Verhältnissen das physikalische Verhalten der Plasmasalze große Abweichungen von der Norm zeigt. Bei manchen Krankheiten kann das freie Calcium relativ vermehrt, bei anderen wieder vermindert sein. Auch gibt es Erkrankungen, bei denen nicht das ganze im Plasma vorhandene Natrium ultrafiltrabel ist.

Die hier mitgeteilten Versuche bestätigen die bekannte Tatsache, daß der Gehalt des Blutes an Elektrolyten und Nichtelektrolyten unter physiologischen Verhältnissen außerordentlich konstant ist. Daß es möglich ist, die normale Isotonie des Blutes und der Gewebssäfte auf experimentellem Wege zu stören, wurde im Laufe der letzten Jahre von verschiedener Seite gezeigt (*Loeb*, *Hoeber*, *Spiro*, *Blum*, *Zondek*, *Stransky* u. a. m.).

Ich gebe hier einige Beispiele meiner eigenen Untersuchungen an:

1. Perorale und intravenöse Zufuhr von *Calciumsalzen* bewirkt ein Ansteigen des Calciums und ein *Absinken des Natriums* nicht nur im Plasma, sondern auch in allen daraufhin untersuchten serösen Körperflüssigkeiten.

Kaninchenplasma:

	Vorher	Nach Calciumzufuhr
Wasser, g-Proz. . . .	91,58	92,8
Asche, g-Proz.	1,098	1,156
Natrium, mg-Proz. .	342,8	309
Kalium, mg-Proz. . .	26,07	19,29
Calcium, mg-Proz. . .	9,16	14,26
Magnesium, mg-Proz.	2,5	1,34

2. Zufuhr von *Natronsalzen* bewirkt ein *Ansteigen des Natriums* und ein *Absinken des Kaliums* und *Calciums im Plasma.*

	Vorher	Nach Zufuhr von NaCl
CO_2, ccm	42,5	35,0
Natrium, mg-Proz. .	340	360
Kalium, mg-Proz. . .	25,0	19,7
Calcium, mg-Proz. . .	11,2	8,9

3. Zufuhr von *Magnesium* bewirkt ein Ansteigen des *Magnesiums* und ein *Absinken des Calciums* im Plasma.

	Vorher	Nach Zufuhr von MgCl
Ca im Plasma, mg-Proz.	11,6	8,54
Ca im Ultrafiltr. "	5,6	7,24
Magnesium, "	2,4	4,0

Diese *Transmineralisation* des Blutes, die man auf experimentellem Wege herbeiführen kann, scheint uns für die Pathologie und Therapie von Interesse zu sein.

Mineralgehalt von Kaninchenorganen.

In einer großen Versuchsreihe habe ich den Mineralgehalt verschiedener Kaninchenorgane (Niere, Leber, Muskel, Herz, Lunge) untersucht. Die von mir erhaltenen Zahlen sind nicht verläßlich, da es mir nicht gelang, die Organe *frei von Blut* zur Analyse zu bekommen. Nur der Wassergehalt der Organe ergab ziemlich konstante Werte. (s. Tabelle III). Nur beim Muskel war es möglich, Werte zu bekommen, die nicht durch beigemengtes Blut entstellt sind. Ich gebe die von mir gefundenen Werte in Tabelle IV wieder. Die Tiere wurden durch Entbluten aus der Carotis getötet, die Muskeln mit einer Scheere zerkleinert und zuerst im Wasserbad, dann im Trockenschrank bei 110^0 bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Aus den Versuchen der Tabelle IV geht hervor, daß die Muskelasche 3 bis 4 Proz. Natrium, 24 bis 29 Proz. Kalium, 0,5 bis 0,6 Proz. Calcium und 0,9 bis 2 Proz. Magnesium enthält.

Tabelle III.
Bestimmung des Wassergehalts von Kaninchenorganen.

Bezeichnung	g Wasser in 100 g der frischen Substanz					
	Nieren	Leber	Muskel	Herz	Milz	Lungen
Kaninchen E	77,96	69,90 70,03	74,58 74,69	—	—	—
„ G	78,50	71,18	76,49 76,70 76,72	80,22	—	78,78
„ H	77,14	73,73 73,60	76,59 77,25	79,40	81,11	—
„ K	77,54	73,92 73,60	75,40 75,60	—	—	—
„ L	77,15	72,99 72,70	77,26 77,40	79,42	78,28	79,73

Blutzuckerbestimmungen.

Es ist ohne weiteres einleuchtend, daß die Kenntnis der Verteilung des Zuckers auf Plasma und Blutkörperchen für die Technik der Blutzuckerbestimmung von praktischer Bedeutung ist. Die Frage, ob und wieviel Zucker die Blutkörperchen von Mensch und Tier enthalten, wird in der deutschen Literatur noch viel diskutiert, während die amerikanischen und französischen Autoren auf Grund vergleichender Untersuchungen des Zuckergehalts von Gesamtblut und Plasma die Ansicht vertreten, daß *sowohl beim gesunden wie beim kranken Menschen als auch beim Tiere der Zuckergehalt des Plasmas und der Blutkörperchen identisch ist.*

Tabelle IV.

Mineralgehalt des Kaninchenmuskels[1]).

Datum 1923/24	Bezeichnung	Proz. der	H_2O	Asche mg	Na mg	K mg	Ca mg	Mg mg	Cl mg
3. XI.	Kaninchen E	Trocken-	—	6799	205,6	1567	37,96	59,13	—
		substanz		6900	205,9	1567			
		frischen	74,58	1728	51,9	398,1	9,64	15,37	—
		Substanz	74,69	1755	51,0	398,0			
		Asche	—	—	2,93	23,01	0,577	0,88	—
4. I.	Kaninchen G	Trocken-	—	7146	320,4	1700	41,00	45,52	—
		substanz		7280	310,6	1700	41,40	45,06	
		frischen	76,49	1666	74,66	400,0	9,73	10,61	—
		Substanz	76,70	1699	72,36	400,0	9,65	10,00	
		Asche	—	—	4,37	24,10	6,56	0,636	—
14. I.	Kaninchen H	Trocken-	—	7069	200,0	1709	38,45	79,20	—
		substanz		6930	200,0	1700	38,52	78,26	
		frischen	76,59	1678	46,22	400,0	9,0	18,54	—
		Substanz		1639	46,32	400,0	9,1	18,32	
		Asche	—	—	2,84	25,0	0,542	1,00	—
5. II.	Kaninchen M	Trocken-	—	6310	204,8	1804	40,0	124,0	220,0
		substanz		6377	210,9	1800	40,0	124,0	220,0
		frischen	75,40	1583	50,20	441	9,80	30,38	53,89
		Substanz	75,62	1600	51,67	441	9,80	30,38	53,89
		Asche	—	—	3,37	29,02	0,644	1,996	3,39
11. II.	Kaninchen L	Trocken-	—	6206	214,58	1810	39,47	130,4	230,0
		substanz		6212	215,92	1810	40,00	131,9	230,0
		frischen	77,26	1409	48,7	410,9	29,60	29,60	52,2
		Substanz	77,40	1407	49,0	410,9	29,94	29,94	52,2
		Asche	—	—	3,48	29,19	2,11	2,11	3,70

Die Gründe für die Unstimmigkeiten der Analysen zahlreicher Autoren wurden von *Etienne* und *Verain*, *Schmid*, *Folin* und *Wu* in einwandfreier und überzeugender Weise dargetan. Diese Autoren haben nämlich den Beweis erbracht, daß eine Blutzuckerbestimmung vom biologischen Standpunkt aus nur dann richtig ist, wenn die Blutkörperchen vollständig hämolysiert sind. Eine vollständige Hämolyse bei gleichzeitiger Glykolyse erreicht man, wenn man das Blut mit *Natriumfluorid ungerinnbar macht.* Ich verweise auf die Arbeiten der genannten Autoren und auf das von mir in früheren Mitteilungen Gesagte und gebe hier nur zwei Beispiele an: gesunder Mensch: im Gesamtblut 94,6 mg-Proz., im Plasma 95,8 mg-Proz. Zucker; Diabetes mell.: im Gesamtblut 306,4 mg-Proz., im Plasma 302 mg-Proz. Zucker.

---

[1]) Diese Analysen wurden im chemischen Laboratorium der medizinischen Klinik *Blum* in Straßburg ausgeführt.

primiert wird. Das Gleichgewicht der Wage wird durch folgende Gleichung ausgedrückt:

$$\text{tang}\ \alpha = \frac{p\,l}{\pi\,d},$$

wobei a den Winkel der Inklination des Wagebalkens, p das Übergewicht auf eine der Schalen, l den Abstand der mittleren Schneiden von den äußeren Schneiden, π das Gewicht der Wagschale und d den Abstand des Unterstützungspunktes vom Schwerpunkt bedeutet. Das Übergewicht ist also der Tangente der Deviation proportional. Daher gibt die Stellung der Mikrometerskala in Verbindung mit dem Faden des Fadenkreuzes mittels einer einfachen Ablesung die Deviation, d. h. die Größe des Übergewichts an. Mit Hilfe einer einzigen Ablesung ist es möglich, die Milligramme bis auf drei Dezimalen genau abzulesen. Es ist einleuchtend, daß diese Wagen, mit welchen man eine Wägung (makro- oder mikroanalytisch) in wenigen Sekunden ausführen kann, unseren deutschen Wagen überlegen sind. Ich hatte in Straßburg Gelegenheit, mit diesen Wagen zu arbeiten, und kann sie wärmstens empfehlen.

Zum *Filtrieren von Niederschlägen*, welche dann gewogen werden, verwenden wir die *Pregl-Filterröhrchen*. Das Röhrchen wird auf eine Saugflasche montiert, mit Asbest gefüllt und mit Schwefelchromsäure, Wasser, Alkohol und Äther gewaschen und bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet.

Diese Filterröhrchen leisteten uns für die Bestimmung des Natriums, Kaliums, Magnesiums, Phosphors und Cholesterins ausgezeichnete Dienste.

Enteiweißungsmethoden.

Zwecks vollständiger Entfernung der Eiweißkörper stehen uns drei prinzipiell verschiedene Methoden zur Verfügung, welche auch vom biologischen Standpunkt aus nicht gleichwertig sind:

1. die Veraschung,
2. die Fällung der Eiweißkörper,
3. die Ultrafiltration.

Die *Veraschungsmethoden* können nur dort angewendet werden, wenn es sich darum handelt, bei Mineralanalysen des Blutes die *absoluten* Werte zu ermitteln, ohne Rücksichtnahme, in welcher Form die Mineralien vorhanden sind. So kann ich die Veraschung auf nassem Wege mit Salpetersäure für die Bestimmung des Chlors, mit Salpetersäure und Schwefelsäure für die Bestimmung des Gesamtphosphors bestens empfehlen, während sich die Veraschung auf trockenem Wege ohne jeglichen Zusatz für die Bestimmung von Natrium, Kalium,

Calcium und Magnesium eignet. Für die Bestimmung der Alkalien und Erdalkalien sind Platingeräte unerläßlich.

Die *Fällungsmittel für Eiweißkörper* sind außerordentlich zahlreich. Für die Bestimmung des Blutzuckers eignet sich die Fällung mit Quecksilbersalzen und Natriumwolframat nach der Vorschrift von *Folin* und *Wu*. Für die Bestimmung des Reststickstoffs ist neben der Ultrafiltration 10proz. Trichloressigsäure sehr geeignet. Eiweißfällungsmittel, welche Harnstoff adsorbieren, wie z. B. die Schwermetalle und Schwermetallsalze, können naturgemäß nicht verwendet werden.

Ein weites Anwendungsgebiet findet die *Ultrafiltrationsmethode* in der Blutanalytik. Mit Hilfe der Ultrafiltration ist es nicht nur möglich, die Eiweißkörper von ihrem Suspensionsmittel quantitativ zu trennen, sondern auch zu bestimmen, in welcher *Form* (d. h. ob echt gelöst oder kolloidal gebunden) die einzelnen Substanzen im Blute kreisen.

Gegenwärtig sind drei verschiedene Ultrafiltrationsapparate in Gebrauch: der Apparat von *Bechhold*, der von *Zsigmondy* und der von *Giemsa*. Nur der letztgenannte ist nach unseren Erfahrungen für Blutanalysen geeignet. Der Apparat von *Giemsa* hat nämlich gegenüber den anderen Ultrafiltrationsapparaten den Vorteil, daß man das Plasma nicht verdünnen muß und mit kleinen Mengen (10 bis 15 ccm) das Auslaugen erreichen kann. Auch ist dieser Apparat viel einfacher und daher billiger als alle übrigen Ultrafiltrationsapparate. Der Apparat besteht aus einer Saugflasche, die einen doppelt durchbohrten Gummistöpsel trägt. Durch die eine Bohrung wird ein kapillares Glasrohr geführt, das in ein Reagenzglas hininreicht. Dieses Reagenzglas von 20 ccm Fassungsraum dient dazu, das Ultrafiltrat aufzufangen. Die andere Öffnung des rechtwinklig gebogenen Glasrohrs trägt einen kleinen Gummistöpsel, an welchem das Ultrafiltrationsröhrchen befestigt wird. Dieses taucht man in das zu ultrafiltrierende Plasma ein. Die zweite Bohrung des Gummistöpsels trägt ein kapillares Glasrohr mit Glashahn, an welchem eine Wasserstrahlpumpe angeschlossen wird. Das Ansatzrohr der Saugflasche wird mit einem Glasrohr verbunden, das in ein Schälchen mit Quecksilber eintaucht und als Manometer dient. Um jede Verdunstung während der Ultrafiltration, welche gewöhnlich mehrere Stunden Zeit in Anspruch nimmt, zu vermeiden, wird das Plasma mit Paraffin überschichtet und einige Kubikzentimeter Wasser in die Saugflasche gegeben. Die Ultrafilter werden aus Eisessigkollodium hergestellt. Man stülpt die Papierhülse über den siebartig durchlochten Porzellanzylinder und taucht das Röhrchen in eine Lösung von Kollodium in Eisessig ein und härtet die Filter mehrere Tage in Wasser. Vor Gebrauch werden die Filter auf Eiweißundurchlässigkeit mit einer 1proz. Lösung von Hämoglobin und einer 5proz. Lösung von Pepton geprüft. Die Ultrafiltrate dürfen weder mit Trichloressigsäure

noch mit Sulfosalicylsäure eine Eiweißreaktion geben. Die eigentliche Ultrafiltration wird folgendermaßen ausgeführt:

10 bis 30 ccm Hirudinplasma werden in einen Meßzylinder hinein gemessen (genaue Messung mittels Pipette) und mit Paraffinöl überschichtet. Man ultrafiltriert bei einem Quecksilberdruck von etwa 150 mm so lange, bis etwa die Hälfte des Plasma ultrafiltriert ist. Die Ultrafiltration von 5 ccm nimmt gewöhnlich 1 bis 2 Stunden Zeit in Anspruch. Das Ultrafiltrat wird nun wieder möglichst genau gemessen, und die Bestimmungen werden im ursprünglichen Plasma, im Ultrafiltrat und im Ultrafiltrationsrückstand ausgeführt. Auf diese Weise hat man die beste Kontrolle dafür, daß die Ultrafiltration und die Analysen richtig ausgeführt wurden. In Übereinstimmung mit *Hirth* und *Tschiember* konnte ich zeigen, daß die einzelnen Portionen des Ultrafiltrats identische Werte geben.

Ich gebe hier einige Beispiele an:

Calciumbestimmung im Menschenplasma.

	Plasma	Ultrafilter 1	Ultrafilter 2	Ultrafilter 3	Rückstand
Ca, mg-Proz.	9,6	4,8	4,9	4,8	16,6
Menge, ccm	25	5	5	5	10
Ca. mg-Proz.	10	5	4,9	4,9	16,5
Menge, ccm	25	5	5	5	9,8
Ca, mg-Proz.	9,6	4,7	4,7	4,9	16,0
Menge, ccm	26	5	5	5	11

Natriumbestimmungen im menschlichen Serum.

	Plasma	Ultrafilter 1	Ultrafilter 2	Ultrafilter 3	Rückstand
Na, mg-Proz.	340	340	340	345	346
Menge, ccm	30	5	6	8	11
Na, mg-Proz.	336	340	340	335	340
Menge, ccm	15	2	2	2	7

Der Ultrafiltrationsmethode kommt also in der Blutanalytik eine doppelte Bedeutung zu:

1. als Enteiweißungsmittel, vor allem für die Bestimmung der Harnsäure;

2. zur Ermittlung des physikalischen Zustands der im Blute vorhandenen Substanzen.

Wir konnten mit Hilfe der Ultrafiltrationsmethode zeigen, daß normalerweise der ganze im Blute kreisende Zucker frei gelöst ist, ferner die Natron-, Kalisalze und die Chloride, während ein Teil des Blutkalks und des Magnesiums kolloidal gebunden ist. Unter pathologischen Verhältnissen kann das physikalische Verhalten der Plasmasalze weitgehend geändert sein. Auf diese Befunde werden wir an anderer Stelle ausführlich eingehen. Ebenso ist es möglich, wie ich

bereits mitgeteilt habe, auf experimentellem Wege das Verhältnis von freiem zu gebundenem Calcium zu beeinflussen.

Die Bestimmung der Konzentration erfolgt mit Hilfe der Trockenrückstandbestimmung in 1 ccm Plasma oder Serum in der gleichen Weise, wie ich sie in früheren Arbeiten angegeben habe.

Die Bestimmung des Blutzuckers.

Für die Bestimmung des Blutzuckers scheint mir die Mikromethode von *Fontès Thivolle* am besten geeignet zu sein.

Da diese Methode bei uns nur wenig bekannt ist, möchte ich sie hier in Kürze mitteilen.

Das Prinzip dieser Methode, welche es gestattet, Zuckermengen von 0,01 bis 1 mg zu bestimmen, ist das Folgende:

Wenn man zu einem Niederschlag von Cu_2O (in feiner Suspension) eine farblose, stark saure Lösung von MoO_3 hinzufügt, so löst sich der Kupferniederschlag auf, während sich gleichzeitig ein intensiv blau gefärbtes Suboxyd des Molybdäns bildet. Fügt man nun Kaliumpermanganat hinzu, so wird das blaue Suboxyd wieder zu farblosen MoO_3 oxydiert. Die Anzahl Kubikzentimeter Kaliumpermanganat, welche zur vollständigen Entfärbung notwendig sind, entsprechen den Zuckermengen.

Enteiweißung nach *Folin* und *Wu* mit Phosphorwolframsäure. 2 ccm des Filtrats werden im Zentrifugenglas mit den *Fehling*schen Lösungen im Wasserbad genau 6 Minuten gekocht und nach dem Erkalten zentrifugiert. Der Kupferniederschlag wird im Phosphormolybdänreagens aufgelöst und mit Kaliumpermanganat auf farblos titriert.

Diese Methode ist einfach und zuverläßlich und gibt die gleichen Werte wie die Methode von *Bertrand*.

Die Bestimmung der Harnsäure.

Den gebräuchlichen Harnsäurebestimmungsmethoden haften, wie schon *Harpuder*, *Mond*, *Griessbach* u. a. m. gezeigt haben, zwei Fehlerquellen an, die die so erhaltenen Werte illusorisch machen.

1. Binden alle Enteiweißungsmittel Harnsäure in beträchtlicher Menge.

2. Ist die Silberfällung der Harnsäure nicht quantitativ.

Die erste Fehlerquelle läßt sich, wie ich schon vor Jahren gezeigt habe, durch *Ultrafiltration* in schwach alkalischer Lösung beheben. Hier leistet der Apparat von *Giemsa* ausgezeichnete Dienste, der es ermöglicht, Ultrafiltrationen vom Serum auszuführen, *ohne das Serum vorher zu verdünnen.*

Auch erweist es sich für den weiteren Gang der Analyse als sehr vorteilhaft, daß jeder störende Zusatz von Säure oder Salzen vermieden wird.

Der Harnsäuregehalt des Plasmas und des Serums ist identisch. Der Harnsäuregehalt des entsprechenden Ultrafiltrats ist immer höher, wie aus nachfolgenden Beispielen hervorgeht:

Bezeichnung	mg-Proz. Harnsäure im		
	Plasma	Serum	Ultrafiltrat
Gesunder Mensch	3,0	3,0	3,8
Gesunder Mensch	2,8	2,6	3,7
Chronische Nephritis, Hypertonie	4,2	—	6,8
Chronische Glomerulonephritis . .	5,2	—	7,6
Lymphatische Leukämie	7,0	6,8	9,0

Bei der Bestimmung der Harnsäure im Plasma oder Serum wurden die Eiweißkörper mit Natriumwolframat nach *Folin* und *Wu* gefällt. An Stelle der Silberfällung der Harnsäure, welche niemals quantitativ ist, verwenden wir die Methode von *Benedict*, welche *Victor Caryl Myers* in seinem Buche angibt. Für die Auswertung der Harnsäure ist nach Ansicht maßgebender Autoren ausschließlich die *kolorimetrische* Methode geeignet.

Die Bestimmung von Calcium und Magnesium.

Für die Bestimmung des Calciums und Magnesiums ist ausschließlich das *Hirudinplasma* geeignet.

Die Mikromethode von *de Waard* liefert nach eigenen Erfahrungen sowie Untersuchungen der Klinik *Blum* in Straßburg i. E. unzuverlässige Werte. Hingegen hat sich uns die Methode von *Jansen* in der Modifikation von *Hirth* für die Bestimmung des Calciums sehr bewährt. Da diese Methode wenig bekannt ist, will ich sie hier in Kürze angeben.

5 ccm *Hirudin*plasma werden in einer *Platinschale* im Wasserbad zur Trockne eingedampft und dann verascht. Die Asche wird am Wasserbad in 2 ccm 4 proz. Salzsäure gelöst und mit doppeltdestilliertem Wasser in ein 50-ccm-Becherglas aus Jenenser Glas übergespült und auf ein Volumen von 15 ccm gebracht. Man setzt 4 Tropfen Eisenchloridlösung und 1 Tropfen Bromwasser zu und kocht auf. Nach dem Erkalten setzt man 1 Tropfen Phenolphthalein zu. Man setzt tropfenweise Ammoniak bis zur schwach alkalischen Reaktion, dann Essigsäure bis zur sauren Reaktion und noch einen Überschuß von 5 Tropfen zu. Man kocht auf und filtriert durch ein kleines, mit Salzsäure und Wasser sorgfältig gewaschenes Filterchen in eine kleine Glasschale. Der Niederschlag wird mit 10 ccm Wasser, dem man 3 Tropfen Essigsäure und 3 Tropfen Ammoniak zugesetzt hat, ausgewaschen. Das

Filtrat wird auf dem Wasserbad auf ein Volumen von 4 ccm eingedampft. Man setzt 1 ccm saure Oxalsäurelösung und 2 ccm gesättigte Ammonoxalatlösung zu und beläßt eine halbe Stunde auf dem Wasserbad. Nach dem Erkalten macht man mit Ammoniak gerade alkalisch und läßt 4 bis 5 Stunden absetzen. Das ausgefällte Calciumoxalat wird abfiltriert und mit heißer verdünnter Ammonoxalatlösung gewaschen. Im Filtrat kann das Magnesium bestimmt werden. Das Calciumoxalat wird mitsamt dem Filter in einen kleinen Platintiegel verascht und stark geglüht. Nach dem Erkalten wird das gebildete Calciumoxyd in 2 ccm n/40 HCl im Wasserbad aufgelöst. Man spült in einen Quarztiegel über und titriert mit Methylrot als Indikator mit n/100 NaOH das nicht verbrauchte HCl zurück.

Das Filtrat von Calciumoxalat inklusive Waschwasser wird in einer Platinschale im Wasserbad bis zur Staubtrockenheit eingedampft, verascht und der Rückstand in verdünnter Salzsäure gelöst und filtriert. Das Filtrat wird bei neutraler Reaktion (Phenolphthalein) im Glasschälchen im Wasserbad auf 4 ccm eingedampft und mit 1 ccm 1 proz. Ammonphosphatlösung und 2 ccm konzentrierten Ammoniaks versetzt. Man läßt 12 bis 14 Stunden absetzen, filtriert und wäscht mit 2,5 Proz. Ammoniak aus. Der Niederschlag wird in 2,5 ccm gleicher Teile verdünnter Salpetersäure und verdünnter Schwefelsäure aufgelöst und mit heißem Wasser nachgewaschen. Man bringt das Volumen auf 7,5 ccm und fällt in der Hitze mit 7,5 ccm Molybdänreagens (Ammonmolybdat in konzentrierter Salpetersäure). Man läßt mehrere Stunden unter öfterem Umschwenken im Dunkeln stehen. Man filtriert durch ein gewogenes Preglfilter, wäscht mit Ammonnitrat, Alkohol, Aceton und Äther aus und trocknet bis zur Gewichtskonstanz.

Diese Methode liefert sowohl für das Calcium als auch für das Magnesium sehr gute Werte. Die von uns gefundenen Zahlen sind 9,6 mg-Proz. Calcium und 2,5 mg-Proz. Magnesium als Normalwerte für den gesunden erwachsenen Menschen. Werte über 10 und unter 9 mg-Proz. für das Calcium sind als pathologisch zu bezeichnen. Eine Abweichung von der Norm im Sinne einer *Verminderung* findet sich viel häufiger als im Sinne einer *Vermehrung*.

Die Bestimmung von Kalium und Natrium.

Da es uns bisher nicht gelungen ist, mit den in der Literatur angegebenen Mikromethoden brauchbare Werte für das Kalium zu erhalten, bestimmen wir das Kalium nach der altbewährten Methode von *Schoesing* und *Wense* als Perchlorat. Diese Methode ist zuverlässig, hat aber den großen Nachteil, daß für eine einzige Bestimmung 15 bis 20 ccm Organflüssigkeit erforderlich sind. Aus diesem Grunde können bis jetzt manche interessante Fragen der Biochemie keiner Lösung

zugeführt werden, und es wäre daher zu begrüßen, wenn eine verläßliche Mikromethode geschaffen würde.

Die Blutkörperchen enthalten weit mehr Kalium als das sie umgebende Plasma. Es ist daher notwendig, die Blutkörperchen vom Plasma durch Zentrifugieren sofort zu trennen, da sonst nicht unbeträchtliche Mengen von Kalisalzen aus den Blutkörperchen in das Plasma diffundieren und man im Plasma zu hohe Werte erhält.

Der Kaliumgehalt des Plasmas und des Serums ist identisch, die Kalisalze befinden sich unter normalen Verhältnissen vollkommen frei gelöst. Ich gebe hier einige Beispiele an.

Bezeichnung	mg Kalium in 100 ccm			
	Plasma	Serum	Ultrafiltrat	Rückstand
Gesunder Mensch . .	25,6	25,0	25,2	26,0
Hypertonie	—	24,6	25,0	25,0
Diabetes mell. . . .	—	24,0	24,6	25,0
Nephritis	—	24,56	24,9	25,2
Kaninchen	26,2	—	—	—
Rind	—	24,6	24,5	24,0

Für die *Bestimmung des Natriums* kann ich die gravimetrische Methode als Natriumpyroantimonat am meisten empfehlen.

Die Methode gestaltet sich kurz wie folgt:

2 ccm Hirudinplasma oder Serum werden in der Platinschale im Wasserbad zur Trockne eingedampft und dann vorsichtig verascht, indem man die Platinschale in eine Quarzschale stellt. Die Asche wird sechsmal mit destilliertem Wasser, dem man einige Tropfen Salzsäure zusetzt, ausgelaugt und schließlich das Filter mit den Aschenrückständen stark geglüht. Die Asche wird mit verdünnter Salzsäure am Wasserbad gelöst, mit den Filtraten vereinigt und in einem Bechergläschen auf ein Volumen von 15 ccm gebracht. Man scheidet unter Zusatz von Eisenchlorid die Phosphate ab, wie bei der Bestimmung des Calciums angegeben wurde, und dampft das Filtrat auf 2 ccm ein. Man macht mit einigen Tropfen KOH gerade alkalisch, setzt unter beständigem Umrühren 10 ccm des Kaliumpyroantimonatreagens und 2 ccm 95 proz. Alkohols zu. Man läßt 1 Stunde absetzen und filtriert durch ein gewogenes Preglröhrchen, wäscht mit 10 ccm 30 proz. Alkohols aus und trocknet bis zur Gewichtskonstanz bei 110°. Gewicht des Niederschlags dividiert durch 11,08 gibt das Natrium in Milligrammen.

Diese Methode wurde in neuester Zeit von *Müller* und *Bálint* in der Weise modifiziert, daß sie zwar wie ich das Natrium als Natriumpyroantimonat fällen, aber den Niederschlag nicht wägen, sondern das Antimon maßanalytisch bestimmen. Das Prinzip dieser Methode ist ausgezeichnet, doch erscheint mir die gravimetrische Methode technisch

handlicher zu sein. Unbedingt notwendig ist es, das organische Material vor der Fällung des Natriums durch Veraschung zu entfernen, während die Fällung der Phosphate nach Ansicht vieler Autoren unterbleiben kann. Die Eiweißkörper mittels *Ultrafiltration* zu entfernen, ist deshalb nicht möglich, da es sich vor kurzem herausgestellt hat, daß zwar normalerweise alles Natrium ultrafiltrabel ist, hingegen unter pathologischen Verhältnissen ein Teil der Natronsalze kolloidal gebunden sein kann.

Die Bestimmung des Chlors.

Zwecks Entfernung der Eiweißkörper für die Bestimmung der Chloride ist nur die Veraschung auf nassem Wege mittels Salpetersäure geeignet. Vor kurzem hat *van Slyke* die bekannte Methode von *v. Koranyi* in der Weise modifiziert, daß er an Stelle einer wässerigen Silbernitratlösung eine salpetersaure Silbernitratlösung verwendet. Beide Methoden geben identische Werte.

Die Bestimmung der Kohlensäure.

Zur Bestimmung der Kohlensäure und der Bicarbonatkonzentration wurde die Alkalireserve im Apparat von *van Slyke* ermittelt.

II. Befunde.

Mineraluntersuchungen im Plasma.

Unter Berücksichtigung aller Kautelen, die ich hier angegeben habe, habe ich im Laufe der letzten 2 Jahre eine große Zahl von chemischen Blutanalysen beim gesunden und kranken Menschen und bei verschiedenen Tieren (Kaninchen, Katze, Hund, Pferd, Rind, Kalb, Schwein) durchgeführt. Ich gebe einige Beispiele meiner Untersuchungen, die ich zum Teil im chemischen Laboratorium der medizinischen Klinik *Blum* in Straßburg i. E. ausgeführt habe, in Tabelle I und II wieder. Es ergibt sich, daß der Mineralgehalt von Mensch und Tier unter physiologischen Verhältnissen außerordentlich konstant ist. *Wir finden normalerweise 330 bis 350 mg-Proz. Natrium, 25 mg-Proz. Kalium, 9,2 bis 9,8 mg-Proz. Calcium, 2,5 mg-Proz. Magnesium, 350 mg-Proz. Chlor bei einem Wassergehalt von 90 g-Proz.* Das Kaninchenblut (im ganzen wurden bisher 48 Kaninchen genau untersucht) unterscheidet sich vom Menschenblut dadurch, daß das Calcium etwas höher eingestellt ist und die Alkalireserve bedeutend niedriger. Während wir beim gesunden Menschen für die Alkalireserve Werte von 55 bis 56 ccm CO_2 finden, fanden wir beim Kaninchen bloß 43 bis 45 ccm CO_2.

Unter pathologischen Verhältnissen können Abweichungen von der Norm nach oben und unten beobachtet werden. Auf diese Befunde werden wir an anderer Stelle ausführlich eingehen.

Tabelle I. Mineralgehalt des normalen Kaninchenplasmas.

Datum	Bezeichnung	Gewicht	Futter	H_2O	CO_2	mg in 100 ccm Plasma					mg in 100 ccm Ultrafiltrat		mg in 100 ccm Rückstand		Bemerkungen
		g		g	ccm	Na	K	Ca	Mg	Cl	Na	Ca	Na	Ca	
25.VI.23	Kaninchen A	2200	Gras	—	—	335	25,9	9,9 9,6	2,30 2,34	—	335	—	340	—	Für die Ultrafiltration 10 ccm Plasma = 5 ccm Ultrafiltrat + 5 ccm Rückstand
1924/25 7. IV.	„ R	1850	Gras	—	45,0	342	26,0	9,16 9,10	—	350	—	—	—	—	
30. VI.	„ C	—	Gras	—	44,6	330	—	10,56	—	—	328	5,46 (51 Proz.)	33,01	15,5	Für die Ultrafiltration 20 ccm Plasma = 10 ccm Ultrafiltrat + 9,8 ccm Rückstand
15. XII.	„ 2	2000	Rüben	92,8	45,0	340,6	—	11,4	2,4	350	340	—	345	—	
5. I.	„ 5	3400	Rüben	—	—	340,0	25,0	11,9	2,4	—	—	6,0 (54 Proz.)	—	—	
5. II.	„ 11	2400	Rüben	93,8	—	330,6	—	12,5	2,5	—	—	6,2 (50 Proz.)	—	—	

Tabelle II. Mineralgehalt des Menschenplasmas.

Datum	Diagnose	H_2O	CO_2	Asche	mg-Proz. im Plasma					mg-Proz. Ultrafiltrat		mg-Proz. im Rückstand		Bemerkung
		g	ccm	g	Chlor	Na	K	Ca	Mg	Na	Ca	Na	Ca	
15.VI. 1923	Normal	90,0	56,5	1,07	350,0	340,0	25,2	9,6	2,5	—	—	—	—	
10.VI. 1924	Normal	90,0	55,9	1,09	355,0	335,6	25,0	9,6	2,5	335	5,0 (52 Proz.)	332	14,2	Für die Ultrafiltration 20 ccm Plasma = 10 ccm Ultrafiltrat + 9,9 ccm Rückstand
22.VI. 1923	Nephr. Hypertonie	—	—	—	360,0	330,0	25,9	9,8 9,4	2,5 2,7	—	—	—	—	
26.VI. 1923	Ödematöse Nephr.	91,5	—	—	—	335,6	26,8	10,16 10,36	1,5	301	—	301	—	
7. IV. 1924	Osteomalacie	—	45,8	—	—	—	—	8,63 8,67	—	—	7,28 (84 Proz.)	—	—	
19. XI. 1924	Ekzem	—	53,0	—	—	—	—	12,16	2,0	—	6,66 (55 Proz.)	—	—	
20. XII. 24	Urticaria	—	56,0	—	—	—	—	12,40	1,72	—	4,98 (40 Proz.)	—	—	

Normalerweise ist alles Natrium, Kalium und Chlor ultrafiltrabel, während nur etwa 54 Proz. der Calciumsalze das Ultrafilter passieren. Auch die Magnesiumsalze sind nur zum Teil ultrafiltrabel. Es erscheint uns interessant und wichtig, daß sowohl unter experimentellen Bedingungen als auch unter pathologischen Verhältnissen das physikalische Verhalten der Plasmasalze große Abweichungen von der Norm zeigt, Bei manchen Krankheiten kann das freie Calcium relativ vermehrt, bei anderen wieder vermindert sein. Auch gibt es Erkrankungen, bei denen nicht das ganze im Plasma vorhandene Natrium ultrafiltrabel ist.

Die hier mitgeteilten Versuche bestätigen die bekannte Tatsache, daß der Gehalt des Blutes an Elektrolyten und Nichtelektrolyten unter physiologischen Verhältnissen außerordentlich konstant ist. Daß es möglich ist, die normale Isotonie des Blutes und der Gewebssäfte auf experimentellem Wege zu stören, wurde im Laufe der letzten Jahre von verschiedener Seite gezeigt (*Loeb*, *Hoeber*, *Spiro*, *Blum*, *Zondek*, *Stransky* u. a. m.).

Ich gebe hier einige Beispiele meiner eigenen Untersuchungen an:

1. Perorale und intravenöse Zufuhr von *Calciumsalzen* bewirkt ein Ansteigen des Calciums und ein *Absinken des Natriums* nicht nur im Plasma, sondern auch in allen daraufhin untersuchten serösen Körperflüssigkeiten.

Kaninchenplasma:

	Vorher	Nach Calciumzufuhr
Wasser, g-Proz. . . .	91,58	92,8
Asche, g-Proz.	1,098	1,156
Natrium, mg-Proz. .	342,8	309
Kalium, mg-Proz. . .	26,07	19,29
Calcium, mg-Proz. . .	9,16	14,26
Magnesium, mg-Proz.	2,5	1,34

2. Zufuhr von *Natronsalzen* bewirkt ein *Ansteigen des Natriums* und ein *Absinken des Kaliums* und *Calciums im Plasma.*

	Vorher	Nach Zufuhr von NaCl
CO_2, ccm	42,5	35,0
Natrium, mg-Proz. .	340	360
Kalium, mg-Proz. . .	25,0	19,7
Calcium, mg-Proz. . .	11,2	8,9

3. Zufuhr von *Magnesium* bewirkt ein Ansteigen des *Magnesiums* und ein *Absinken des Calciums* im Plasma.

	Vorher	Nach Zufuhr von MgCl
Ca im Plasma, mg-Proz.	11,6	8,54
Ca im Ultrafiltr. „	5,6	7,24
Magnesium, „	2,4	4,0

Diese *Transmineralisation* des Blutes, die man auf experimentellem Wege herbeiführen kann, scheint uns für die Pathologie und Therapie von Interesse zu sein.

Mineralgehalt von Kaninchenorganen.

In einer großen Versuchsreihe habe ich den Mineralgehalt verschiedener Kaninchenorgane (Niere, Leber, Muskel, Herz, Lunge) untersucht. Die von mir erhaltenen Zahlen sind nicht verläßlich, da es mir nicht gelang, die Organe *frei von Blut* zur Analyse zu bekommen. Nur der Wassergehalt der Organe ergab ziemlich konstante Werte. (s. Tabelle III). Nur beim Muskel war es möglich, Werte zu bekommen, die nicht durch beigemengtes Blut entstellt sind. Ich gebe die von mir gefundenen Werte in Tabelle IV wieder. Die Tiere wurden durch Entbluten aus der Carotis getötet, die Muskeln mit einer Scheere zerkleinert und zuerst im Wasserbad, dann im Trockenschrank bei 110° bis zur Gewichtskonstanz getrocknet. Aus den Versuchen der Tabelle IV geht hervor, daß die Muskelasche 3 bis 4 Proz. Natrium, 24 bis 29 Proz. Kalium, 0,5 bis 0,6 Proz. Calcium und 0,9 bis 2 Proz. Magnesium enthält.

Tabelle III.
Bestimmung des Wassergehalts von Kaninchenorganen.

Bezeichnung	g Wasser in 100 g der frischen Substanz					
	Nieren	Leber	Muskel	Herz	Milz	Lungen
Kaninchen E	77,96	69,90 70,03	74,58 74,69	—	—	—
„ G	78,50	71,18	76,49 76,70 76,72	80,22	—	78,78
„ H	77,14	73,73 73,60	76,59 77,25	79,40	81,11	—
„ K	77,54	73,92 73,60	75,40 75,60	—	—	—
„ L	77,15	72,99 72,70	77,26 77,40	79,42	78,28	79,73

Blutzuckerbestimmungen.

Es ist ohne weiteres einleuchtend, daß die Kenntnis der Verteilung des Zuckers auf Plasma und Blutkörperchen für die Technik der Blutzuckerbestimmung von praktischer Bedeutung ist. Die Frage, ob und wieviel Zucker die Blutkörperchen von Mensch und Tier enthalten, wird in der deutschen Literatur noch viel diskutiert, während die amerikanischen und französischen Autoren auf Grund vergleichender Untersuchungen des Zuckergehalts von Gesamtblut und Plasma die Ansicht vertreten, daß *sowohl beim gesunden wie beim kranken Menschen als auch beim Tiere der Zuckergehalt des Plasmas und der Blutkörperchen identisch ist.*

Tabelle IV.

Mineralgehalt des Kaninchenmuskels[1]).

Datum 1923/24	Bezeichnung	Proz. der	H_2O	Asche mg	Na mg	K mg	Ca mg	Mg mg	Cl mg
3. XI.	Kaninchen E	Trocken-	—	6799	205,6	1567	37,96	59,13	—
		substanz		6900	205,9	1567			
		frischen	74,58	1728	51,9	398,1	9,64	15,37	—
		Substanz	74,69	1755	51,0	398,0			
		Asche	—	—	2,93	23,01	0,577	0,88	—
4. I.	Kaninchen G	Trocken-	—	7146	320,4	1700	41,00	45,52	—
		substanz		7280	310,6	1700	41,40	45,06	
		frischen	76,49	1666	74,66	400,0	9,73	10,61	—
		Substanz	76,70	1699	72,36	400,0	9,65	10,00	
		Asche	—	—	4,37	24,10	6,56	0,636	—
14. I.	Kaninchen H	Trocken-	—	7069	200,0	1709	38,45	79,20	—
		substanz		6930	200,0	1700	38,52	78,26	
		frischen	76,59	1678	46,22	400,0	9,0	18,54	—
		Substanz		1639	46,32	400,0	9,1	18,32	
		Asche	—	—	2,84	25,0	0,542	1,00	—
5. II.	Kaninchen M	Trocken-	—	6310	204,8	1804	40,0	124,0	220,0
		substanz		6377	210,9	1800	40,0	124,0	220,0
		frischen	75,40	1583	50,20	441	9,80	30,38	53,89
		Substanz	75,62	1600	51,67	441	9,80	30,38	53,89
		Asche	—	—	3,37	29,02	0,644	1,996	3,39
11. II.	Kaninchen L	Trocken-	—	6206	214,58	1810	39,47	130,4	230,0
		substanz		6212	215,92	1810	40,00	131,9	230,0
		frischen	77,26	1409	48,7	410,9	29,60	29,60	52,2
		Substanz	77,40	1407	49,0	410,9	29,94	29,94	52,2
		Asche	—	—	3,48	29,19	2,11	2,11	3,70

Die Gründe für die Unstimmigkeiten der Analysen zahlreicher Autoren wurden von *Etienne* und *Verain*, *Schmid*, *Folin* und *Wu* in einwandfreier und überzeugender Weise dargetan. Diese Autoren haben nämlich den Beweis erbracht, daß eine Blutzuckerbestimmung vom biologischen Standpunkt aus nur dann richtig ist, wenn die Blutkörperchen vollständig hämolysiert sind. Eine vollständige Hämolyse bei gleichzeitiger Glykolyse erreicht man, wenn man das Blut mit *Natriumfluorid ungerinnbar macht.* Ich verweise auf die Arbeiten der genannten Autoren und auf das von mir in früheren Mitteilungen Gesagte und gebe hier nur zwei Beispiele an: gesunder Mensch: im Gesamtblut 94,6 mg-Proz., im Plasma 95,8 mg-Proz. Zucker; Diabetes mell.: im Gesamtblut 306,4 mg-Proz., im Plasma 302 mg-Proz. Zucker.

---

[1]) Diese Analysen wurden im chemischen Laboratorium der medizinischen Klinik *Blum* in Straßburg ausgeführt.

Aus unseren Ultrafiltrationsversuchen geht ferner hervor, daß der *ganze im Blute kreisende Zucker frei gelöst ist*. Für die verbreitete Annahme einer Zuckerbindung an Eiweiß fehlt daher jeder Anhaltspunkt. Ich gebe hier einige Beispiele unserer Untersuchungen an:

Bezeichnung	mg Zucker im		
	Plasma	Ultrafiltrat	Rückstand
Kaninchen	105,6	106,2	105,2
Pferd	102,4	103,6	104,2
Normaler Mensch	93,4	92,6	92,5
Diabetes mellitus	244	244	244

Zusammenfassung.

1. Beschreibung der aperiodischen Analysenwagen von *Longue*.

2. Beschreibung einiger Präzisionsmikromethoden für die Bestimmung von Natrium, Calcium, Magnesium und Zucker.

3. Die Mineralkonzentration des Menschen- und Tierplasmas ist normalerweise außerordentlich konstant.

4. Die Natron-, Kalisalze und Chloride, ebenso der Zucker sind unter physiologischen Verhältnissen vollkommen ultrafiltrabel, während nur ein Teil der Calcium- und Magnesiumsalze das Ultrafilter passieren.

5. Es ist möglich, auf experimentellem Wege eine Transmineralisation des Blutes herbeizuführen.

6. Die Mineralkonzentration des Kaninchenmuskels ist ebenfalls sehr konstant.

7. Der Blutzucker ist vollkommen gleichmäßig auf Plasma und Blutkörperchen verteilt.

Auf die Polemik des Herrn Professor *Falta* und seiner Mitarbeiter kann ich an dieser Stelle nicht eingehen, da diese Herren nichts *Sachliches* gegen mich vorbringen.

Literatur.

1) *Emil Abderhalden*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **25**, 65, 1898. — 2) *R. A. Allers* und *S. Bondi*, diese Zeitschr. **6**, 366, 1907. — 3) *L. Ambard*. Bull. Soc. Chim. Biol. **2**, 202, 1920. — 4) *Edward F. Adolph*, Journ. of Phys. **85**, 114, 1921. — 5) *J. Harold Austin* and *Donald D. van Slyke*. Journ. of biol. Chem. **41**, 345, 1920; **45**, 461, 1921. — 6) *Walter Baumecker*. diese Zeitschr. **142**, 142, 1924. — 7) *A. Boehme*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **108**, 522, 1911; Verh. d. deutsch. Kongr. f. inn. Med. **27**, 488, 1910. — 8) *Michael Bálint*, diese Zeitschr. **150**, 425, 1924. — 9) *R. Brinkman*, Arch. Néerl. de Phys. de l'homme et des anim **6**, 467, 1922. — 10) *R. Brinkman* und *E. van Dam*, Proceedings **22**, 1, 1919. — 11) *Stanley R. Benedict*. Journ. of biol. Chem. **51**, 187, 1922. — 12) *O. Bruhns*, Zeitschr. f. analyt.

Chem. **59**, 337, 1920. — 13) *E. J. Bigwood*, Bull. de la Soc. de Chim. Biol. **6**, 118, 1924. — 14) *H. Bechhold*, Zeitschr. f. physik. Chem. **60**, 257, 1907; **64**, 328, 1908; Kolloid-Zeitschr. **1**, 107, 1906; **2**, 3, 1907. — 15) *Kurt Bluehdorn* und *Grete Genck*, diese Zeitschr. **135**, 581, 1923. — 16) A. *P. Briggs*, Journ. of biol. Chem. **57**, 351, 1923. — 17) *A. Bornstein* und *W. Griesbach*, diese Zeitschr. **106**, 190, 1920. — 18) *G. Bunge*, Zeitschr. f. Biol. **10**, 295, 1874. — 19) *O. Budde* und *E. Freudenberg*, Klin. Wochenschr. 1924, S. 232. — 20) *M. Boenninger*, Zeitschr. f. exper. Pathol. u. Ther. **11**, 1, 1912. — 21) *Derselbe*, diese Zeitschr. **128**, 482, 1922. — 22) *H. Bierry* et *L. Moquet*, C. r. des séances de la Soc. de Biol. **90**, 1316, 1924. — 23) *Francis H. Mc Crudden*, Journ. of biol. Chem. **7**, 83, 1910. — 23) *W. Denis*, ebendaselbst **41**, 363, 1920. — 24) *E. A. Doisy* and *R. D. Bell*, ebendaselbst **45**, 313, 1921. — 25) *Delaville* et *Marianne Richter-Quittner*, C. r. des séances de la Soc. de Biol. **91**, 595, 1924. — 26) *G. Etienne* et *M. Verain*, ebendaselbst **86**, 394, 1922. — 27) *George E. Ewe*, Amer. Journ. of Pharm. **92**, 401, 1920. — 28) *Richard Ege*, diese Zeitschr. 87, 77, 1918; **107**, 229, 1920. — 29) *Richard Ege* et *V. Henriques*, C. r. des séances de la Soc. de Biol. **85**, 610, 1921. — 30) *G. Fontès* et *Thivolle*, Bull. de la Soc. de Chim. Biol. **3**, 266, 1921. — 31) *Otto Folin* and *Hsien Wu*, Journ. of biol. Chem. **38**, 81, 1919; **41**, 367, 1920. — 32) *Otto Folin* and *Harry Trimble*, ebendaselbst **60**, 327, 1924. — 33) *Otto Folin, Hilding Berglund* and *Chifford Derrick*, ebendaselbst **60**, 361, 1924. — 34) *G. L. Foster*, ebendaselbst **40**, 291, 1923. — 35) *G. Giemsa*, diese Zeitschr. **132**, 488, 1922. — 36) *D. Gerhardt* und *W. Schlesinger*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **42**, 83, 1898. — 37) *W. Griesbach*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **37**, 145, 1924. — 38) *R. Glogne* et *A. Richaud*, Bull. Soc. de Chim. Biol. **3**, 66, 1921. — 39) *Isidor Greenwald* and *Joseph Gross*, Journ. of biol. Chem. **54**, 589, 1922. — 40) *K. Harpuder*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **32**, 378, 1923; Klin. Wochenschr. 1923, S. 2209. — 41) *K. Harpuder* und *R. Mond*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **27**, 54, 1922. — 42) *Rudolf Hoeber*, Pflügers Arch. **166**, 531, 1917; **192**, 104, 1922. — 43) *A. Hirth*, C. r. des séances de la Soc. de Biol. 88, 458, 1923. — 44) *A. Hirth* et *Klotz*, ebendaselbst 88, 1153, 1923. — 45) *A. Hirth* et *Tschiember*, ebendaselbst **91**, 594, 1924. — 46) *W. Heubner* et *P. Rona*, diese Zeitschr. **135**, 248, 1922. — 47) *H. C. Hagedorn*, Blodsukkerregulationen hos menesket. **24**, 1921. — 48) *H. C. Hagedorn* and *Norman Jensen*, diese Zeitschr. **135**, 46, 1923. — 49) *W. H. Jansen*, Zeitschr. f. phys. Chem. **101**, 176, 1918. — 50) *von Koranyi*, Zeitschr. f. klin. Med. **33**, 7, 1897. — 51) *B. Kramer* and *John Howland*, Journ. of biol. Chem. **43**, 35, 1920. — 52) *B. Kramer* and *F. Tisdall*, ebendaselbst **46**, 467, 1921; **47**, 475, 1921; **57**, 475, 1923. — 53) *Hans Mueller*, Helv. chim. A. **6**, 1152, 1923. — 54) *Victor Caryl Myers*, Practical chemical analysis of blood, S. 144. St. Louis 1924. — 55) *B. S. Neuhausen* and *J. B. Pincus*, Journ. of biol. Chem. **57**, 99, 1923; **60**, 361, 1924. — 56) *M. Richter-Quittner*, diese Zeitschr. **124**, 111, 1922; **133**, 417, 1922. — 57) *Derselbe*, ebendaselbst **150**, 492, 1923; Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **44**, 385, 1925; C. r. des séances de la Soc. de Biol. **91**, 594, 596, 598, 1924. — 58) *Th. W. Richards, Charles Caffrey* und *Harold Bisbee*, Zeitschr. f. anorg. Chem. 28, 71, 1901. — 59) *Wilh. Schlesinger*, Zeitschr. f. klin. Med. **55**, 1, 1904. — 60) *F. Schmid*, C. r. des séances de la Soc. de Biol. **87**, 1367, 1922. — 61) *M. Luigi Sabbatani*, ebendaselbst **54**, 716, 1902. — 62) *Donald D. van Slyke*, Journ. of biol. Chem. **52**, 495, 1922; **30**, 289, 1917; **38**, 167, 1919; 58, 523, 1924. — 63) *Karl Spiro*, Schw. med. Wochenschr. **51**, 457, 1921; Monatsh. f. Kinderheilk. **25**, 39, 1924. — 64) *Harald A. Sal-*

vesen and *Geoffry Lindner*, Journ. of biol. Chem. **58**, 617, 1923. — 65) *Harald A. Salvesen, A. Baird Hawtings, J. F. Intosh*, ebendaselbst **60**, 327, 1924. — 66) *Emil Stransky*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **78**, 1132, 1914. — 67) *Milliard Smith*, Journ. of biol. Chem. **45**, 437, 1921. — 68) *Frederic Tisdall* und *Bwnjamin Kramer*, ebendaselbst **46**, 1, 1921. — 69) *D. J. de Waard*, diese Zeitschr. **97**, 176, 186, 1919. — 70) *Ernst Wiechmann*, Pflügers Arch. **182**, 74, 1920; Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **41**, 462, 1924. — 71) *S. G. Zondek*, diese Zeitschr. **121**, 87, 1921; Klin. Wochenschr. 1923, S. 382. — 72) *Hsien Wu*, Journ. of biol. Chem. **51**, 21, 1921. — 73) *R. Zsigmondy*, Zeitschr. f. angew. Chem. **26**, 447, 1913. — 74) *R. Zsigmondy* und *W. Bachmann*, Zeitschr. f. anorg. u. allgem. Chem. **10**, 119, 1918.

Die Wirkung des Piperidins auf die Calciumdeposition.

Von

Stephan Éderer.

(Aus der Kinderabteilung des Johns-Hopkins-Hospital und dem Hunterian Laboratory der Johns-Hopkins-Universität.)

(Eingegangen am 12. März 1925.)

Bei der experimentellen Rachitis der Ratte mit Lebertran wird der Heilprozeß von einer erhöhten Viskosität und erhöhtem Globulingehalt des Serums begleitet (1). Diese Erhöhung ist ein sehr frühes Zeichen der Heilung und beginnt mit dem Anfang der Kalkablagerung in den Knochen nachweisbar zu werden. Das veränderte physikochemische Verhalten des Serums, das mit einer Änderung in der Serumproteinstruktur einhergeht, läuft parallel mit dem im hiesigen Laboratorium angewandten „line test" von *P. G. Shipley* (mikroskopischer Nachweis der Kalkablagerung mit Silbernitrat).

Es war für uns von Interesse zu beobachten, wie Substanzen, die in vitro viskositäterhöhend wirken, den rachitischen Prozeß und die Kalkdeposition in irgend einer Weise beeinflussen können. Unter diesen Substanzen konnte als geeignetstes Mittel auf Grund theoretischer und praktischer Betrachtungen Piperidin (Hexahydropyridin) gewählt werden. Es wirkt nach den Experimenten von *Pauli* und *Handovsky* (2, 3) erheblich erhöhend auf die Viskosität und wird von Eiweiß gebunden. Die pharmakologische Wirkung dieses Alkaloids besteht, in toxischen Dosen gegeben, in Blutdrucksteigerung (4), es wirkt lähmend auf die motorischen Endplatten (5), hat keine ausgesprochene Wirkung auf das zentrale Nervensystem, und hat aber nur in toxischen Dosen eine degenerierende Wirkung auf die roten Blutkörperchen, indem es Vacuolen verursacht. Diese körnchenartige Degeneration der roten Blutzellen wurde von *Gürber* (6) nur nach subkutaner Injektion von *toxischen* Dosen *nach* der Entwicklung der Lähmung beobachtet.

Es ist von Interesse, daß das Hämatoporphyrin, eigentlich auch eine Pyridinverbindung im Kerne, nach den Versuchen von *van Leersum* (7) die Entwicklung von Rachitis verhütet und Deposition des Calciums verursacht. Ob diese Wirkung eine spezifische ist oder auf dem Wege

der Lichtsensibilisation sich entfaltet, wird in diesen Experimenten unentschieden gelassen.

Nun wird aber Piperidin per os in viel größeren Dosen vertragen als subkutan, ohne die kleinste toxische Wirkung bemerken zu lassen. So wurde piperidinum bitartaricum von *Tuncliffe* und *Rosenheim* (8) in Dosen von 1,2 g gegen Gicht empfohlen.

In den nachstehenden Versuchen wurde das Piperidin den Ratten in das Futter vermischt gegeben. Die Ratten erhielten die rachitiserzeugende Kost Nr. 3143 von *Mc Collum*.

Zusammensetzung von Futter Nr. 3143.

Mais	33,0
Weizen	33,0
Weizengluten	15,0
Gelatine	15,0
NaCl	1,0
$CaCO_3$	3,0

Das Piperidin wurde mit Essigsäure neutralisiert und in einer Konzentration von 0,5 bis 1,5 Proz. mit dem fein pulverisierten Futter gründlich vermischt. Zum Versuch wurden junge Ratten benutzt, die teils nach der Entwicklung von Rachitis an Nr. 3143 das Piperidin erhielten, teils sofort mit Piperidin vermischtes Futter Nr. 3143 bekommen haben. Es wurden insgesamt 28 Ratten untersucht. Es muß hervorgehoben werden, daß die Ratten das so präparierte Futter gut gefressen haben, während des ganzen Experiments munter waren, von einer etwaigen toxischen Wirkung konnten nicht einmal andeutende Zeichen beobachtet werden. Während in den Experimenten von *van Leersum* hervorgehoben wird, daß die Tiere die Hämatoporphyrininjektionen nicht gut vertragen haben. Der Heileffekt des Hungerns, der im hiesigen Laboratorium nachgewiesen wurde, kann auf Grund der obigen Beobachtungen auch nicht in Betracht kommen.

Die Feststellung des Effekts auf den Knochen wurde auf die mikrochemische Methode von *Shipley* („line test“) und auf histologische Untersuchungen gegründet.

Wegen Raumersparnis können die Resultate dieser Fütterungsversuche kurz in dem folgenden geschildert werden.

In einer Konzentration von 0,5 Proz. Piperidin im Futter Nr. 3143 konnte in vorher gesunden Ratten die Ausbildung des rachitischen Prozesses nicht beeinflußt werden. Der „line test“ war in allen Fällen negativ.

In einer Konzentration von 1 Proz. nach 2 Wochen wurde in den rachitischen Rattengruppen in der Mehrzahl der Tiere eine ausgesprochene Calcification und stark positiver „line test“ gefunden;

in einem kleineren Teile war der „line test“ nur schwach positiv, was als beginnende Heilung gedeutet wird. Das Verhältnis dieser Gruppen war 3 : 1.

In einer Konzentration von 1,5 Proz. nach 4 Wochen Fütterung konnten weder in den gesunden noch in den rachitischen Ratten Zeichen von Rachitis nachgewiesen werden. Die Deposition des Kalkes war ausgesprochen und gab stark positiven „line test“.

Bei der histologischen Untersuchung erwies sich aber die Knochenstruktur nicht normal, sie zeigte alle charakteristischen Zeichen einer Osteoporose mit normaler Calcification, mit ausgebildeter präparativer Calcificationszone, keine rachitische Metaphyse, und das osteoide Gewebe war in physiologischen Grenzen entwickelt. In den Untersuchungen von *McCollum*, *Simmonds*, *Shipley*, *Park* (9) über experimentelle Rachitis entwickelte sich die Osteoporose immer, wenn die Diät defizient an Calcium und Phosphor war und außerdem mit Lebertran ergänzt wurde. Derselben Erscheinung begegneten *Sherman* und *Papenheimer* (10), wenn sie in ihrer rachitiserzeugenden Diät, bestehend aus 95 Proz. Patentmehl, 3 Proz. Calciumlactat, 2 Proz. NaCl, mit oder ohne Zusatz von Ferricitrat 0,1 Proz. das Kalksalz ausgelassen haben, so entstand immer Osteoporose. Hinsichtlich dieser Tatsachen ist es von Interesse, daß in den bevorstehenden Untersuchungen die Osteoporose an der Diät Nr. 3143 sich entwickelte, die defizient ist an Phosphor und an „A“-Faktor, und an Calcium zweimal die optimale Menge enthält. Trotzdem also das Verhältnis zwischen Calcium und Phosphor in der Nahrung stark verschoben war im Vergleich zu dem optimalen Verhältnis, das zu einer normalen Ablagerung der Knochensubstanz notwendig ist, und trotz des Fehlens des antirachitischen Faktors konnte der Organismus unter dem Einfluß des verfütterten Alkaloids die vorhandene minimale Menge Phosphor so ausnutzen, daß die Ablagerung normaler Knochensubstanz vor sich gehen konnte. Daß die Struktur des Knochens eine Osteoporose aufwies, bedeutet nur eine quantitative Abweichung der Ausnutzung der Mineralien der Nahrung, hinweisend darauf, daß Piperidin an sich nicht so effektiv ist wie der fettlöslich antirachitische Faktor im Lebertran.

Zusammenfassung.

Durch Fütterung einer chemisch gut definierten Substanz wie Piperidin konnte die Ausbildung des rachitischen Prozesses verhindert werden. Piperidin fördert die Assimilation der zur Knochenbildung nötigen Mineralien und die Ablagerung der Knochensubstanz, bleibt aber in dieser Wirksamkeit der im Lebertran enthaltenen antirachitischen Substanz gegenüber zurück. Es kann die Vermutung ausgesprochen werden, daß diese Befunde als Ausgang einer Arbeitshypothese dienen könnten, in welcher Richtung die Definition des antirachitischen Faktors zu suchen wäre.

Ich kann es nicht unterlassen, und es dient mir zum größten Vergnügen, meinen verbindlichsten Dank Herrn Dr. *P. G. Shipley* auszudrücken, der die Liebenswürdigkeit gehabt hat, die histologischen Untersuchungen zu übernehmen.

Literatur.

1) *St. Éderer*, Journ. of biol. Chem. **60**, 621, 1924. — 2) *W. Pauli*, Kolloidchemie der Eiweiße. 1922. — 3) *Handovsky*, diese Zeitschr. **25**, 510, 1910. — 4) *S. Fränkel*, Arzneimittelsynthese **5**, 295. Berlin 1921. — 5) *A. J. Kunkel*, Handb. d. Toxikologie, S. 654. Jena 1901. — 6) *Gürber*, Arch. f. Entwicklungsgeschichte, physiol. Abtl. 1890, S. 401. — 7) *E. C. van Leersum*, Journ. of biol. Chem. **58**, 835, 1923/24. — 8) *Tuncliffe* und *Rosenheim*, Lancet. 1898, S. 189. — 9) *V. McCollum*, *N. Simmonds*, *P. G. Shipley*, *E. A. Park*, Journ. of biol. Chem. **47**, 507, 1921. — 10) *Sherman* und *Pappenheimer*, Proc. soc. exp. biol. Med. **18**, 193, 1920/21.

Die Wirkung des fettlöslichen „A"- und des wasserlöslichen „B"-Faktors bei einseitiger Ernährung.

Von

Stephan Éderer.

(Aus der biochemischen Abteilung der „School of Hygiene" der Johns-Hopkins-Universität in Baltimore Md.)

(Eingegangen am 12. März 1925.)

Hungernde Tiere entwickeln keine Defizienzerscheinungen, die einer Avitaminose ähnlich wären. Solche pathologische Zustände entstehen nur, wenn das Tier gefüttert wird und ein Fehlen der einzelnen Ergänzungsfaktoren dazu kommt. Die Ergänzungsfaktoren werden nur bei der Assimilation körperfremder Ernährungsstoffe benötigt. Hinsichtlich dieser Tatsache entsteht nun die Frage, in welchem Maße und in welcher Weise die Ergänzungsfaktoren die Assimilation der einzelnen Nahrungsstoffe, wie die der Kohlenhydrate, Proteine und Fette, fördern.

In den nachstehenden Versuchen wurde die Annäherung dieser Frage in der Weise durchgeführt, daß verschiedene Rattengruppen einseitig ernährt wurden und dabei die einzelnen Ernährungsfaktoren fehlten. Da Ratten das „C"-Vitamin in ihrem Nahrungshaushalt nicht benötigen, so konnte die Wirkung dieses Faktors in diesen Versuchen nicht erprobt werden.

Bei der Ausführung des Experiments wurden die Ratten in zwei Hauptgruppen geteilt. Die eine Gruppe erhielt nur „A"-Vitamin in Form von Butter oder Lebertran, die andere nur den „B"-Faktor in ihrer Nahrung in Form von Hefe. Binnen dieser Hauptgruppen waren vier Untergruppen von je vier Ratten. Gruppe a erhielt eine Nahrung, die hauptsächlich aus Kohlenhydraten bestand, Gruppe b eine hauptsächlich aus Protein bestehende Mischung, Gruppe c wurde hauptsächlich an Fett gehalten und Gruppe d, die als Kontrolle diente, erhielt eine normale Mischung aller drei Nahrungsstoffe. Außer dem Hauptnahrungsstoff, der die Mischung charakterisierte, erhielten die Ratten ein Minimum von Eiweiß von 5 Proz. Casein, von der Salz-

mischung Nr. 185[1]) 3,7 Proz. und Agar-Agar 2 Proz. Hefe wurde in einer Menge von 2 Proz., Butter in 5 Proz. und Lebertran in 2 Proz. gegeben. Diese Mengen sind im hiesigen Laboratorium seit Jahren erprobt und werden zur Komplementierung der Nahrungsmischungen als Routine angewendet.

Kontrollgruppen mit einseitiger Ernährung und vollem Vitamingehalt wurden nicht aufgestellt, weil erstens die Wirkung der bloßen einseitigen Ernährung bekannt ist und das Hauptgewicht dieser Untersuchungen nicht an dieser Frage lag, andererseits stellt uns der Vergleich der zwei defizienten Hauptgruppen miteinander einen genügenden Maßstab zur Hand in der Beurteilung der Wirkung.

Ratten ertragen eine einseitige Ernährung ziemlich gut, wie es die Untersuchungen von *Osborne* und *Mendel* zeigen, die Ratten teils bei hochprozentiger Protein-, teils bei fettreicher Diät hielten. Bei einem Gemisch von 90 Proz. Casein, 5 Proz. Gliadin, 5 Proz. Salz, 0,2 Proz. Hefe und 0,4 Proz. Alfalfa konnten die Versuche bis über 240 Tage fortgeführt werden, die Ratten erreichten ein Gewicht von ungefähr 250 g, und dann setzte die Entwicklung aus. Die Ratten von *Drummond*, *Crowden*, *Hill*, die mit 83 Proz. Casein, 5 Proz. Hefeextrakt, 5 Proz. Citronensaft, 2 Proz. Lebertran und 5 Proz. Salz gefüttert wurden, behielten ihre Gesundheit vorzüglich und erreichten ein Gewicht von durchschnittlich 140 g am 130. Tage. Diese Resultate stehen im Gegensatz zu *Asada*, dessen Tiere an Eiweißkost und Mohrrüben nur 3 bis 4 Wochen lebten. In den Experimenten von *Polvogt*, *Mc Collum* und *Simmonds* lebten die Ratten 500 Tage bei einer proteinreichen Diät (40 Proz.), zeigten aber am Ende des Experiments eine Degeneration der Nieren.

Die Wirkung einer fettreichen Diät an sich wurde von *Osborne* und *Mendel* studiert, die Ratten an überwiegend aus Fett bestehender Diät hielten (65 bis 77 Proz. total Fett), komplementiert mit Lebertran, Salz und Hefe. Die Tiere konnten über 300 Tage bei dieser Diät gehalten werden, sie entwickelten sich nicht über 280 g. *Asada* hatte Ratten bei einseitiger Fettnahrung und frischen Mohrrüben über 10 Wochen in guter Gesundheit erhalten. Die Ursache, daß Ratten einseitige Fettnahrung so überraschend gut vertragen können, ist in der Eigentümlichkeit des Stoffwechsels des Rattenorganismus zu suchen, daß sich in diesen Tieren bei einseitiger Fettnahrung überhaupt keine Acidose entwickelt, wie es die Untersuchungen von *Wiggelsworth* nachgewiesen haben.

[1]) Salzmischung Nr. 185 von *McCollum* besteht aus NaCl 0,173, $MgSO_4$ anhydr. 0,266, NaH_2PO_4 0,347, K_2HPO_4 0,954, $CaH_4(PO_4)_2H_2O$ 0,540, Fe-Citrat 0,118, Ca-Lactat 1,3.

Bei einseitiger und vitaminfreier Nahrung erhielt *Asada* die folgenden Resultate: Bei Eiweißernährung war die Lebensdauer 2½ Wochen, bei Fettnahrung 3 bis 4 Wochen, bei Stärke 4 bis 5 Wochen, bei Zucker 5 bis 6 Wochen, bei gemischter Nahrung 8 Wochen. Was die Folgen einseitiger Kohlenhydraternährung bei *vollständiger* Vitaminfreiheit betrifft, so stimmen alle Beobachter darin überein, daß die avitaminösen Erscheinungen früher auftreten und die Lebensdauer verkürzt wird.

Keine Experimente wurden bis jetzt unternommen, in welchen die Defizienz, bei einseitiger Nahrung, nur auf einen *einzigen Ergänzungsfaktor* beschränkt wurde, um so den Effekt dieses Faktors zu bestimmen.

Zu diesem Zweck wurden die bevorstehenden Versuche unternommen. Die Zusammensetzung der einzelnen Nahrungsmischungen ist aus den Tabellen ersichtlich.

Gruppe 3 (und 8) wurde bei einer 90proz. Proteinmischung gehalten. Gruppe 3 erhielt nur „B“-Vitamin in Form von Hefe, Gruppe 8 nur „A“-Vitamin in Lebertran. Bei der mit Hefe komplementierten Diät lebten die Ratten länger, 5 bis 8 Wochen, ohne an Gewicht besonders zu verlieren. Die Xerophthalmie entwickelte sich in der vierten Woche. *Ohne „B“-Vitamin* zeigen sie einen *jähen Sturz* und gehen meistens binnen *vier* Wochen zugrunde (Tabelle I).

Tabelle I.

	Proz.		Ratte Nr. 1	2	3	4
		Gruppe 3.				
Casein	89,3	Anfangsgewicht	62	63	58	51
Salzgemisch	3,7	1. Woche	54	57	48	44
Agar	2,0	2. „	57	63	51	42
Hefe	2,0	3. „	64	62**	53	38**
		4. „	66**	57	48**	37
		5. „	75	*	50	39
		6. „	71		*	39
		7. „	63			*
		8. „	52*			
		Gruppe 8.				
Casein	89,3	Anfangsgewicht	48	45	59	58
Salzgemisch	3,7	1. Woche	48	40	55	46
Agar	2,0	2. „	52	41	49	42
Lebertran	2,0	3. „	49	38	39	36
		4. „	50	36	*	*
		5. „	43	*		
		6. „	37*			

* Bedeutet den Tod des Tieres. ** Bedeutet Auftreten der Xerophtalmie.

Ähnliche Wirkung hat die Entziehung der „B“-Vitamine bei kohlenhydratreicher Diät. Gruppe 6, die *kein „B“-Vitamin* erhielt, zeigt von Anfang an einen *abfallenden Verlauf der Gewichtskurve*, und die Ratten konnten über *sechs* Wochen nicht am Leben erhalten werden. Dagegen lebten die mit Hefe gefütterten Tiere der Gruppe 1 bis 8 Wochen lang und konnten ihr Gewicht bis kurz vor dem Tode aufrecht erhalten. Die Xerophthalmie entwickelte sich in derselben Zeit wie die der bei gemischter Nahrung gehaltenen Tiere (Tabelle II).

Tabelle II.

	Proz.		Ratte Nr. 1	2	3	4
		Gruppe 6.				
Casein	5,0	Anfangsgewicht	51	68	46	58
Salzgemisch . . .	3,7	1. Woche	52	62	48	57
Agar	2,0	2. „	50	61	47	52
Dextrin	87,3	3. „	49	58	45	49
Lebertran	2,0	4. „	45	56	42	46
		5. „	40	52	41	43
		6. „	*	48	39	*
				*	33*	
		Gruppe 1.				
Casein	5,0	Anfangsgewicht	50	67	72	52
Dextrin	87,3	1. Woche	50	63	69	49
Salzgemisch . . .	3,7	2. „	50	62	68	50
Agar	2,0	3. „	52	64	73	51
Hefe	2,0	4. „	51	69	75	51
		5. „	52**	74	76	49
		6. „	49	72**	74**	47**
		7. „	38	63	60	41
		8. „	*	66	50*	41
		9. „		*		*

Tabelle III. Gruppe 2.

	Proz.		Ratte Nr. 1	2	3	4
Casein	5,0	Anfangsgewicht	79	65	73	63
Fett	87,3	1. Woche	75	60	74	62
Salzgemisch . . .	3,7	2. „	68	54	68	56
Agar	2,0	3. „	*	46	*	*
Hefe	2,0	4. „		43		
		5. „		41		
		6. „		40		
		7. „		35**		
		8. „		34		
		Gruppe 7.				
Casein	5,0	Anfangsgewicht	58	62	59	49
Fett	87,3	1. Woche	51	58	49	42
Agar	2,0	2. „	44	47	44	41
Salzgemisch . . .	3,7	3. „	38	39	36	31
Butter	5,0	4. „	35	34	31	28
		5. „	*	*	*	*

* Bedeutet den Tod des Tieres. ** Bedeutet Auftreten der Xerophtalmie.

Tabelle IV.

	Proz.		Ratte Nr. 1	2	3	4
		Gruppe 4.				
Casein	18,0	Anfangsgewicht	56	55	67	53
Dextrin	47,3	1. Woche	69	73	80	60
Fett	27,0	2. „	78	81	84	69
Agar	2,0	3. „	83	86	89	78
Salzgemisch . . .	3,7	4. „	92	89	90	87
Hefe	2,0	5. „	95	83	90	91
		6. „	93**	77**	87	90**
		7. „	92	73	82**	89
		8. „	85	64	80	87
		Gruppe 5.				
Casein	18,0	Anfangsgewicht	53	62	49	59
Dextrin	47,3	1. Woche	65	73	57	71
Fett	27,3	2. „	71	72	69	76
Agar	2,0	3. „	76	68	69	81
Salzgemisch . . .	3,7	4. „	74	63	71	84
Butter	5,0	5. „	73	61	71	87
		6. „	69	60	66	85
		7. „	68	58	65	89
		8. „	65	56	63	93

** Bedeutet Auftreten der Xerophtalmie.

Am kürzesten lebten die Tiere bei *fettreicher* Nahrung und *„A“-Vitamindefizienz,* nicht länger als 3 Wochen (Tabelle III, Gruppe 2). Nur ein Tier überlebte die anderen, das von den Leichen dieser gefressen hatte. Die Gruppe 7, die mit fettreicher Nahrung und mit „A“-Faktor versehen wurde, zeigt auch einen *steilen Gewichtssturz* und eine Lebensdauer von 5 Wochen.

Tabelle IV zeigt die Resultate der mit normaler *gemischter Nahrung* gefütterten Tiere, die aber an einem oder dem anderen Vitamin defizient war. Diese Tiere waren *über 8 Wochen alle noch am Leben,* am Ende der vierten Woche trat der bekannte Gewichtsverlust ein, der immer entsteht, wenn in der Nahrung eines der beiden Vitamine fehlt.

Die Schwierigkeit, die sich uns bei den Schlußfolgerungen aus diesen Tatsachen gegenüberstellt, ist die kurze Lebensdauer der Tiere, die bei dieser Anordnung der Versuche immer zu erwarten ist. Versuche mit einer nur partiellen Avitaminose werden in weiterem Sinne die aufgeworfene Frage beantworten. Zur Feststellung des Effektes *der einseitigen Ernährung bei einseitiger totaler Avitaminose* war aber nur diese Anordnung am zweckmäßigsten.

Von den ausgesprochenen Differenzen der Lebensdauer und der Gewichtskurve scheinen uns die folgenden Schlüsse berechtigt zu sein:

Das wasserlösliche „B“-Vitamin hat einen fördernden Einfluß auf die Assimilation, so der Proteine, wie der Kohlenhydrate. Die

Tiere bei solcher einseitigen Nahrung erhalten ihr Gewicht länger und haben auch längere Lebensdauer bei Anwesenheit von „B"-Vitamin, als beim Fehlen dieses Faktors, wenn auch alle anderen Faktoren ergänzt werden.

Für den fettlöslichen „A"-Faktor konnte diese Eigenschaft nicht nachgewiesen werden.

Die Fettenergie kann im Tierkörper nur in der Gegenwart beider Faktoren ausgenutzt werden.

Literatur.

Th. B. Osborne und *L. Mendel*, Journ. of biol. Chem. **59**, 13, 1924. – *Drummond, Crowden, Hill*, Journ. of Physiol. **56**, 43, 1922. — *Asada*, diese Zeitschr. **139**, 234, 1923. *L. M. Polvogt, McCollum, N. Simmonds*, John Hopkins Hosp. Bulletin **34**, 168, 1923. — *V. B. Wiggelsworth*, Biochem. Journ. **18**, 6, 1203, 1924. — *Funk, Dubin*, Science **52**, 447, 1920. – *McCarrison*, Brit. Med. Journ. **1**, 249, 1920. — *Simpson, Barr*, ebendaselbst **1**, 49, 1920. — *Tscherkes*, diese Zeitschr. **133**, 75, 1922.

Über die nephelometrische Bestimmung von Calcium und Magnesium.

Von

Leonia Kriss.

[Aus dem medizinisch-chemischen Institut der Universität Lwów (Lemberg).]

(Eingegangen am 13. März 1925.)

Während einer Arbeit, in welcher versucht wird, einige Methoden der physiologisch - chemischen Analyse auf die Wasseranalyse anzuwenden, habe ich unter anderen Methoden auch die Verwendung nephelometrischer Kalkbestimmungen als Härtebestimmung geprüft. In dem Nephelometer nach *Kleinmann*[1]) (der Firma *Schmidt* und *Haensch*) besitzen wir ein Instrument, welches den besten Kolorimetern gleichwertig ist, und die Anwendung der Kalkbestimmung mittels des Natriumsulforizinatreagens nach *Rona* und *Kleinmann* schien, was Genauigkeit und Handlichkeit betrifft, für die Härtebestimmung geeignet zu sein.

Rona und *Kleinmann*[2]) haben die Bedingungen, unter welchen durch Sulforizinat Trübungen in Kalksalzlösungen hervorgerufen werden, genau studiert und für die Entwicklung und Messung dieser Trübungen Vorschriften ausgearbeitet; sie haben ferner ihre Methode auf die Analyse der Blutasche angewandt. Da die Blutasche außer Kalksalzen auch Magnesiumsalze enthält, wurde auch die Entwicklung meßbarer Trübungen in Magnesiumsalzen von *Rona* und *Kleinmann* versucht; nach der Feststellung, daß in Magnesiumsalzen durch das Reagens Trübungen hervorgerufen werden, betrachten die Autoren die Summe der in Blutaschelösungen entwickelten Trübungen als „Erdalkalioxyde". Eine Auflösung dieser Summe in Calcium und Magnesium wird späteren Arbeiten vorbehalten.

In Analysen, in welchen nach vorheriger Kalkabscheidung als Oxalat Magnesium durch das Sulforizinatreagens bestimmt werden

---

[1]) Diese Zeitschr. **137**, 144, 1923.

[2]) Ebendaselbst **137**, 157, 1923.

sollte, erhielt ich nun gar keine Trübungen, obwohl Magnesium als Magnesiumammoniumphosphat nachweisbar war, und obwohl das Reagens in reinen Lösungen von Magnesiumsalzen Trübungen entwickelte. Es stellte sich heraus, daß die Anwesenheit von Ammoniumsalzen die Fällung von Magnesiumsalzen durch Sulforizinat vollständig verhindert. Es genügt, zu einer Lösung von Magnesiumsulfat eine schwach alkalische Lösung von Chlorammonium hinzuzufügen, damit dieselbe auf Zusatz von Sulforizinatreagens klar und optisch leer bleibt. So geben auch Mischungen von Kalksalzen mit Magnesiumsalzen nach Zusatz von Ammoniumsalzen mit dem Reagens nur Trübungen, die dem Kalkgehalt entsprechen. Ich verwende etwa 10 Mol Ammonsalz für jedes Grammion Mg, um die Fällung zu verhindern.

Es konnten keine Bedingungen gefunden werden, unter welchen Magnesium mittels des nephelometrischen Reagens so gefällt würde, daß eine Messung gegen einen Kalkstandard möglich wäre; eine Bestimmung der Gesamthärte auf diesem nephelometrischem Wege erwies sich nicht möglich. Dafür aber konnte die nephelometrische Methode zu einer schnellen und exakten Bestimmung der Kalkhärte ausgebildet werden, worüber an anderer Stelle berichtet werden soll.

Da *Rona* und *Kleinmann* in ihren Blutanalysen die Blutasche in Salzsäure auflösten, mit Ammoniak neutralisierten und dann erst die Sulforizinattrübung entwickelten, so stellen ihre Werte nicht die „Erdalkalioxyde", sondern reine Kalkbestimmungen dar; es konnte unter den Arbeitsbedingungen dieser Forscher kein Magnesium in die Trübungen eingehen.

Eine einfache Mikrozucker- bzw. Blutzuckerbestimmung.

Von

L. Lorber.

(Aus dem Zentrallaboratorium der Krankenhäuser der jüdischen Gemeinde in Budapest.)

(Eingegangen am 18. März 1925.)

Die zahlreichen Methoden zur klinischen Mikrozuckerbestimmung sind sehr umständlich und nehmen sehr viel Zeit in Anspruch, so daß sie besonders zu Serienbestimmungen wenig geeignet sind. Ich teile im folgenden eine Methode mit, die mit ihren Titer nicht verändernden Lösungen schneller als die bisherigen Mikromethoden mit einfachen Mitteln auszuführen ist und genaue Werte liefert, daher zu Serienbestimmungen sehr geeignet ist. Bei reinen Zuckerlösungen dauert die Bestimmung 5 bis 6 Minuten, bei Eiweiß enthaltenden Flüssigkeiten mitsamt Enteiweißung 8 bis 10 Minuten.

Von der Methode im allgemeinen.

Das Wesen der Bestimmung ist identisch mit dem der Methoden *Allihns* und *Bertrands*. Bei beiden Methoden reduziert der Zucker Kupfersulfat und gemessen wird die Quantität des bei der Reduktion gebildeten Cu O. Bei beiden Methoden wird das ausgefällte Cu O mittels Filtrierens abgesondert, sodann bestimmt die erstere Methode das Cu O gravimetrisch, während die zweite es titrimetrisch ausführt.

Bei der unten beschriebenen Methode habe ich das Cu O mittels Zentrifugierens abgeschieden und zur Messung desselben ein kolorimetrisches Verfahren ausgearbeitet.

Auch *Blanc*[1]) entfernt das Cu O in seiner Mikromethode mittels der Zentrifuge, aber er vergleicht dann die Höhe der reduzierten Cu O-Säule mit einer Cu O-Säule, welche er durch Reduktion einer bekannten Zuckerlösung erhält.

Die zu der Bestimmung notwendigen Lösungen und Instrumente.

1. 7proz. $CuSO_4 + 5\,H_2O$-Lösung.
2. 350 g Seignettesalz + 100 g NaOH, aufgefüllt mit destilliertem Wasser bis zur Marke in einem 1-Liter-Kolben.

---

[1]) Inaug.-Diss. aus dem Hygien. Inst. der Universität Budapest.

Diese Lösungen sollen aus chemisch reinsten Reagenzien bereitet werden, womöglich nach deren Umkristallisieren. Die Mischung beider soll keine Selbstreduktion geben.

3. 1 proz. HNO_3-Lösung, welche aus der in der Apotheke erhältlichen offizinellen HNO_3 durch Verdünnung zu bereiten ist.

4. Offizinelle konzentrierte (30 proz.) H_4NOH-Lösung.

5. 1 proz. H_2O_2-Lösung, welche drei- bis viertäglich aus der offizinellen (30 proz.) frisch zu bereiten ist.

Letztere drei Lösungen können auch in Tropfgläsern gehalten werden, wodurch das Pipettieren überflüssig wird.

6. Kolorimeter. Ich benutze das Kolorimeter *Autenrieths*, doch kann natürlich auch jedes andere gebraucht werden. In den Vergleichskeil kommt eine 0,05 Proz. Cu enthaltende Cupriammoniumsulfat-Lösung, welche auf die Weise hergestellt wird, daß wir von Lösung 1 (7 proz. $CuSO_4$-Lösung) 56,09 cm^3 auf 100 auffüllen (diese Lösung wird dann auf Cu umgerechnet gerade 1 proz. sein), von dieser 1 proz. Cu-Lösung messen wir 5 cm^3 ab, geben dazu 20 cm^3 der Lösung 4 und füllen das Ganze mit destilliertem Wasser auf 100 cm^3 auf. *In 1 cm³ dieser Lösung sind 0,5 mg Cu enthalten, was laut Bestimmung 0,25 mg Dextrose entspricht.*

Diese Keilflüssigkeit war im gut verschlossenen Keil nach 4 Monaten unverändert.

Die Zuckerskala des Kolorimeters kann man leicht selber eichen, wenn man weiß, daß der Nullpunkt einer Zuckerkonzentration von 0,25 mg entspricht und alle zehn Skalenteile 0,025 mg weniger bedeuten, somit ein Skalenteil 0,0025 mg Zucker entspricht; z. B.

Skalenteil	0	= 0,25 mg	Zucker im cm^3	
,,	20	= 0,20 ,,	,, ,, ,,	
,,	40	= 0,15 ,,	,, ,, ,,	
,,	60	= 0,10 ,,	,, ,, ,,	
,,	80	= 0,05 ,,	,, ,, ,,	usw.

Es ist empfehlenswert, daß ein jeder sein Kolorimeter selber in der Weise kalibriert, daß er von der oben beschriebenen Kolorimeterkeilflüssigkeit sich verschiedene Verdünnungen bereitet. Die Verdünnungen stellt man mit einer verdünnten H_4NOH-Lösung [20 cm^3 konzentrierter H_4NOH (Lösung 4) + 80 cm^3 destillierten Wassers] her, und vergleicht dieselben, in die Küvette gegeben, mit dem Keil. Wenn das Kolorimeter genau gefertigt wurde, erhalten wir obige Werte, wenn wir aber nicht zu denselben gelangen, so müssen wir entsprechende Korrektionen vornehmen.

7. Dampfentwickelnder Apparat. Ein 300 cm^3 fassender Kochkolben, welcher mit zweimal durchbohrtem Stöpsel versehen ist. In das eine Bohrloch geben wir ein zweimal gebogenes Glasrohr, dessen

freies längeres Ende 7 cm lang dünn ausgezogen ist; in das andere Bohrloch gelangt ein rechtwinklig gebogenes Rohr, auf das wir einen Gummischlauch ziehen; das Ende dieses Gummischlauchs, welches mit einer kurzen Glasröhre versehen ist, pressen wir mit dem *Katzenstein*schen Kompressor (nach *Hoffmann*) zu und hängen es auf. Den Kolben füllen wir halb mit destilliertem Wasser, in welches wir, um gleichmäßig zu sieden, etwas Talk geben (destilliertes Wasser siedet nämlich gleichmäßiger, auch braucht dann der Talk nur selten erneuert zu werden).

Wir kochen die zu reduzierende Zuckerlösung mit diesem Dampfentwickler und regulieren das Kochen mit dem Regulierkompressor[1]).

8. Breite, in $^1/_{100}$ cm^3 eingeteilte Zentrifugierröhrchen mit abgerundetem, nicht konischem Boden.

Die Bestimmung.

Wir messen von der zu bestimmenden Zuckerlösung, abhängig von der zu erwartenden Zuckermenge, 0,1 bis 2 cm^3 (der Zucker soll nicht mehr als 2 mg betragen) in ein Zentrifugierröhrchen ab, geben 1 cm^3 von der Mischung der Lösungen 1 und 2 hinzu und füllen es auf 3 cm^3 auf. Nachdem nun im Kochgefäß das Sieden in Gang gekommen und bei geschlossenem Kompressor der ganze Dampf durch das ausgezogene Glasrohr entweicht, erfassen wir mit einer Cornet-Pinzette das Zentrifugierröhrchen, stellen es unter das ausgezogene Ende des zweimal gebogenen Glasrohres, so daß es darin eingetaucht, fast bis zum Boden des Zentrifugierröhrchens reicht. Das Kochen der Lösung beginnt alsbald (nach 10 bis 15 Sekunden), wonach wir den Kompressor so weit öffnen (achtgeben, daß die Lösung nicht ausspritzt), bis die Lösung schön gleichmäßig siedet. Die Dauer des Siedens beträgt $1^1/_2$ Minuten vom Moment des Eintauchens des ausgezogenen Glasrohres an.

Nach dem Sieden kühlen wir das Zentrifugierröhrchen rasch ab und zentrifugieren scharf (die Parallelbestimmungen werden zusammen zentrifugiert). Nach $1\frac{1}{2}$ bis 2 Minuten ist das CuO scharf abzentrifugiert. Von dem unten angesammelten CuO können wir die Flüssigkeit ohne Verlust an Bodensatz abgießen. Zur Entfernung des an der Röhrchenwand anhaftenden $Cu(OH)_2$ geben wir — ohne Aufrührung des Niederschlags — einige Kubikzentimeter destillierten Wassers dazu und zentrifugieren von neuem.

---

[1]) Das dem dünnen Rohr des Dampfentwicklers anhaftende CuO wird mit etwas angesäuertem Wasser entfernt.

Die kolorimetrische Bestimmung des Cu O.

Nach Abgießen des destillierten Wassers geben wir 0,3 cm³ (= 6 Tropfen) der Lösung 3 zum Cu O und schütteln ein wenig auf; das Cu O löst sich in der HNO_3 (es ist kein Fehler, wenn die Lösung keine vollkommene ist). Nun geben wir 0,2 cm³ (4 Tropfen) der Lösung 4 und einen Tropfen der Lösung 5 zum Inhalt des Zentrifugierröhrchens. Während des Schüttelns löst sich der Niederschlag unter Blasenbildung mit schöner blauer Farbe des entstandenen Cupriammoniumsalzes. Das Ganze füllen wir, wenn wir die Bestimmung in kalibrierten Zentrifugierröhrchen ausgeführt haben, auf 1 cm³ auf. Wenn aber kalibrierte Zentrifugierröhrchen nicht vorhanden sind, so messen wir die blaue Lösung in die Küvette des Kolorimeters ab, geben ein paar Tropfen Wasser in das Zentrifugierröhrchen, und das zu 1 cm³ fehlende Wasser übertragen wir von diesem in die Küvette. Nach mehreren Ablesungen berechnen wir die Cu-Menge bzw. den Zuckergehalt der Lösung. Die die Kolorimetrie störenden Gasbläschen werden durch mehrmaliges kräftiges Durchblasen mittels der Pipette von der Wand entfernt. Falls die Farbe zu dunkel ist, verdünnen wir so lange, bis sie sich zur Kolorimetrie eignet; jedoch entsprechend den Kubikzentimetern der Verdünnung geben wir je 0,2 cm³ konzentriertes H_4NOH hinzu. Den Grad der erforderlichen Verdünnung können wir nach einiger Übung schon von vornherein aus der Größe des Cu O-Niederschlags abschätzen[1]). Beim Ablesen niedriger Zuckerwerte leistet eine — vor das graue Fenster des Kolorimeters gehaltene — blaue Glasplatte gute Dienste. Zur genauen Messung dieser niedrigen Werte können wir auch einen zweiten Keil benutzen, welcher die halbe Menge Cu enthält. (2,5 cm³ 1 proz. Cu-Lösung + 20 cm³ konzentrierter H_4NOH ad 100 aqua.)

In eiweißfreien Medien ist die Zuckerbestimmung ohne jede Vorbereitung auszuführen.

Den Zuckergehalt eiweißhaltiger Zuckerlösungen bestimmen wir nach vorhergehender Enteiweißung. Als Beispiel teile ich etwas ausführlicher die vom klinischen Gesichtspunkt wichtige *Bestimmung des Blutzuckergehalts* mit.

Zur Bestimmung muß man das Blut bzw. Serum enteiweißen. Hierzu fand ich die Wolframsäure-Methode am geeignetsten[2]).

Bei einem Normo- oder Hypoglykämiker messen wir 0,3 cm³ Blut oder 0,25 cm³ Serum in ein Zentrifugierröhrchen, ergänzen diese Menge mit

---

[1]) Statt auf kolorimetrischem Wege kann man auch die Menge des Cu titrimetrisch bestimmen. Man löst das Cu O in $Fe_2(SO_4)_3$ und titriert mit n/100 oder n/200 $KMnO_4$, so wie auch *Bertrand* (Bull. de la soc. chim. de Paris **35**, 1285, 1906) in seiner Makromethode es angibt.

[2]) Siehe *Pinkussen* Mikromethode, 2. Aufl., S. 62.

destilliertem Wasser auf 2,0 bzw. 1,5 cm³ [1]), geben 0,5 cm³ einer 10proz. Natriumwolframatlösung und tropfenweise 0,5 cm³ $^2/_3$ n H_2SO_4 hinzu (letztere wird aus der normalen in der Weise hergestellt, daß wir 20 cm³ derselben auf 30 cm³ verdünnen). Das Eiweiß flockt aus. Nun schließen wir das Zentrifugierröhrchen mit reinem Gummistöpsel fest, schütteln kräftig und zentrifugieren scharf ab. Von der klaren Flüssigkeit messen wir nun 1,5 cm³ in ein Zentrifugierröhrchen ab (= 0,15 cm³ Serum oder Blut) und führen die Reduktion bzw. die Bestimmung, wie oben angegeben, aus.

Bei Diabetikern (= Hyperglykämikern) genügen 0,2 cm³ Blut bzw. Serum, dieselben werden auf 1,0 cm³ verdünnt; Enteiweißung wie oben; zur Reduktion benutzen wir 1 cm³ (= 0,1 cm³ Serum).

Die mit der obigen Methode ausgeführten Blutzuckerbestimmungen kontrollierte ich mit der bei klinischen Untersuchungen am meisten angewandten *Bang*schen Methode und erhielt mit dieser gut übereinstimmende Werte. Die Zuckerwerte waren stets kleiner, als diejenigen bei der *Bang*schen Methode, was jedoch auch bei der *Bertrand*schen Zuckerbestimmung der Fall ist.

Frank und *Bretschneider* [2]) erhielten mit der *Bertrand*schen Methode den wirklichen Zuckergehalt des Serums, was sie mit Gärungsproben beweisen konnten, während *Bang* sämtliche reduzierenden Substanzen nachweist. Nach *Horst* und *Hatlehol* [3]) geben die Methoden von *Hagedorn*, *Jensen*, *Folin-Wu* und *Benedict* noch größere Werte als diejenige von *Bang*. Aus mehr als 300 Bestimmungen teile ich hier einige mit:

Bang Proz.	Die neue Methode Proz.	Bemerkung
	Normale Werte.	
0,07	0,065	
0,10	0,088	
0,08	0,069	
0,12	0,092	Nephritis mit 171 mg R.-N.
	Werte bei Diabetes.	
0,14	0,135	
0,26	0,24	
0,15	0,14	
0,24	0,235	
0,18	0,17	
0,175	0,161	
0,37	0,35	

[1]) Entnehmen wir das Blut der Fingerkuppe, so saugen wir es ab von der Stirnwunde in ein, 1,7 cm³ dest. Wasser enthaltendes Zentrifugierröhrchen, entweder mittels einer kalibrierten Pipette, oder mittels einer, dem Zentrifugierröhrchen aufgesetzten *Ernst-Weiss*schen Pipette, im letzteren Falle aber wird das dest. Wasser erst nach dem Abmessen des Blutes in das Zentrifugierröhrchen gebracht, durchgesogen durch die Pipette bis zur Marke.

[2]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **71**, 157.

[3]) Journ. of biol. Chem. **42**, 347.

Aus den angeführten Daten ist ersichtlich, daß obige Methode immer um 0,005 bis 0,02 mg Zucker weniger als die von *Bang* ergibt, ferner, daß als Normalwerte die Zuckerwerte zwischen 0,06 bis 0,09 Proz. zu betrachten sind.

Blutzucker mg	Die hinzugegebene Zuckermenge mg	Gesamtzuckergehalt		Differenz	
		berechnet	gefunden	mg	Proz.
0,1375	0,090	0,2275	0,2300	+ 0,0025	1,1
0,100	0,250	0,350	0,3525	+ 0,0025	0,71
0,100	0,500	0,600	0,600	—	—
0,072	0,1409	0,2129	0,2125	— 0,0004	0,18
0,072	0,0937	0,1657	0,1645	— 0,0012	0,72

Aus der vorstehenden Tabelle ist ersichtlich, daß ich die dem Serum hinzugegebene Zuckermenge mit einer minimalen Fehlerquelle von 1 Proz. zurückbekommen habe.

Endlich bemerke ich noch, daß die Parallelbestimmungen entweder vollkommen oder mit nur geringer Differenz übereinstimmten.

Die Zuckerbestimmung ist auch im *Liquor cerebrospinalis* ausführbar, nur müssen wir 0,5 cm^3 Liquor verwenden, dazu 1,5 cm^3 aqua destillata, 0,25 cm^3 Natriumwolframat + 0,25 H_2SO_4, sodann abzentrifugieren. Zur Reduktion verwenden wir 2 cm^3 Flüssigkeit (= 0,4 cm^3 Liquor).

Über extravasale Änderungen der Blutreaktion des Menschen.

Von

J. Holló und St. Weisz.

(Aus der I. medizinischen Klinik der Universität Budapest.)

(Eingegangen am 21. März 1925.)

Die Erscheinung der Nachsäuerung des Blutes, die seit *Zuntz'*[1]) Entdeckung (1868) bekannt ist und in einer Verminderung seiner Kohlensäurekapazität beim Stehen besteht, hat erst in neuerer Zeit größere Bedeutung gewonnen, seitdem man nämlich begonnen hat, die Untersuchung der Wasserstoffzahl sowie der Kohlensäurekapazität des Blutes der klinischen Forschung nutzbar zu machen.

Christiansen, Douglas und *Haldane*[2]) haben gezeigt, daß die Nachsäuerung schon innerhalb kurzer Zeit das Bindungsvermögen des Blutes vermindert; diese Verminderung kann bei Körpertemperatur in 20 Minuten etwa 2,5 Proz. betragen; *Haggard* und *Henderson*[3]) haben später sogar schon in 8 Minuten eine Verminderung von 2 Vol.-Proz. gefunden. Das ist also jedenfalls ein Umstand, der bei der Konstruktion von sogenannten Bindungskurven, wo das Blut bei Körpertemperatur mit Atmosphären von verschiedenem CO_2-Gehalt ins Gleichgewicht gebracht wird, nicht ohne weiteres vernachlässigt werden kann, besonders dann nicht, wenn die Bindungskurven zur Ermittlung der Wasserstoffzahl des Blutes nach *Haggard* und *Henderson*[4]) dienen sollen, denn bei diesem Verfahren wird jeder Fehler in der Bestimmung des Bindungsvermögens in seiner Wirkung auf die Genauigkeit der daraus ermittelten Wasserstoffzahl bedeutend vergrößert.

Straub und *Meier*[5]) haben gefunden, daß die Nachsäuerung ausbleibt, wenn das Blut steril entnommen und auf Eis aufbewahrt wird, was allerdings von *Cobet*[6]) nicht für jeden Fall bestätigt werden konnte. Sie lassen die Frage offen, ob die Senkung der Kohlensäurekapazität außerhalb des Körpers, entgegen der Ansicht von *Christiansen, Douglas* und *Haldane*[7]), doch auf bakterieller Einwirkung beruht, und versichern nur so viel, daß die Zersetzung durch Bakterienwachstum beschleunigt wird.

---

[1]) Beitr. z. Physiol. d. Blutes. Bonn 1868.
[2]) Journ. of Physiol. **48**.
[3]) Ebendaselbst **45**.
[4]) Ebendaselbst **39**.
[5]) Deutsch. Arch. f. klin. Med. **129**.
[6]) Diese Zeitschr. **137**.
[7]) Journ. of Physiol. **48**.

Weitere Untersuchungen von *Haggard* und *Henderson*[1]), *Mellanby* und *Thomas*[2]), und vor allem von *Evans*[3]) haben bedeutend zur Klärung der Frage beigetragen. *Evans* hat gezeigt, daß die Säureproduktion durch eine hauptsächlich an die Gegenwart von weißen Blutkörperchen gebundene, fermentative Glykolyse (in Milchsäure) hervorgerufen wird, die durch Zusatz von 0,1 Proz. NaF verhindert werden kann. Er konnte die älteren Beobachtungen über die Unregelmäßigkeit der Erscheinung, sowie über die beschleunigende Wirkung des niedrigen CO_2-Druckes (alkalische Reaktion) und der Körpertemperatur bestätigen. Die Mitwirkung von Bakterien hält *Evans* für möglich, aber nicht wahrscheinlich, ohne jedoch die Frage näher untersucht zu haben. Als Beispiel für die quantitative Seite der Erscheinung gibt *Evans* an, daß die Kohlensäurekapazität im Blute einer hyperventilierten Katze in 1½ Stunden bei Zimmertemperatur um 3,5 Vol.-Proz. abgenommen hat.

Uns hat — aus praktischem Grunde — der Einfluß der Nachsäuerung speziell auf die *Wasserstoffzahl* des Blutes interessiert, welches wir, nach der Vorschrift unserer Methode zur Bestimmung der aktuellen Blutreaktion[4]), verdünnt und in luftdicht verschlossenen Zentrifugierröhrchen aufbewahrt haben. Zwei Umstände wirken dabei gegen die Nachsäuerung: Erstens, daß das geschlossen aufbewahrte Blut eine höhere Wasserstoffzahl hat als das offen aufbewahrte, und zweitens der Gehalt unserer Verdünnungsflüssigkeit an Oxalat. Dagegen ist folgendes zu vermerken: Das infolge der Nachsäuerung verschwindende Bicarbonat wird in freie Kohlensäure verwandelt [*Evans*[5])]; da die Reaktion des Blutes durch das Verhältnis CO_2/HCO_3 bestimmt wird, so ist die bei der Nachsäuerung entstehende prozentuelle Erhöhung der Wasserstoffzahl jedenfalls bedeutend größer als die prozentuelle Abnahme des Bindungsvermögens. Die Ausschläge der Wasserstoffzahl infolge der Nachsäuerung sind also viel größer als jene des Bindungsvermögens, und die Verfolgung der Wasserstoffzahl die feinere Methode zur Untersuchung der Nachsäuerung. Daraus ergibt sich aber zugleich, daß die Genauigkeit von Wasserstoffzahlmessungen im Blute, speziell wenn dieselben bei Körpertemperatur ausgeführt werden, durch die Nachsäuerung noch mehr gefährdet wird, als jene von Bestimmungen der Kohlensäurekapazität.

Unsere Versuche haben zu folgenden Ergebnissen geführt:

Die Nachsäuerung ist eine in quantitativer Hinsicht unregelmäßige Erscheinung, die in verschiedenen Blutproben und unter anscheinend gleichen äußeren Bedingungen zu verschiedenen Erhöhungen der Wasserstoffzahl führen kann.

---

1) Journ. of biol. Chem. **45**.
2) Journ. of Physiol. **54**.
3) Ebendaselbst **56**.
4) Diese Zeitschr. **144**.
5) Journ. of Physiol. **56**.

Ihre Größe hängt in erster Linie von der Temperatur ab; bei Bruttemperatur kann die Wasserstoffzahl des aufbewahrten Blutes in 24 Stunden eine Erhöhung von über 100 Proz. zeigen, im Eiskasten dagegen (bei 5 bis 8° C) haben wir während dieser Zeit meist nur angedeutete Veränderungen gefunden. Bei Zimmertemperatur genügen unter Umständen schon 2 bis 3 Stunden, um die Wasserstoffzahl des aufbewahrten Blutes merklich (um 10 bis 15 Proz.) zu erhöhen.

Untersuchungen sowohl mit *steril* als mit *nicht steril* aufbewahrtem Blute, *mit* und *ohne* Zusatz von NaF, haben uns gezeigt, daß die Nachsäuerung wenigstens zwei Ursachen hat. Die eine — die von *Evans* genau studierte Glykolyse — läßt sich durch Zugabe von 0,1 Proz. NaF beheben; die andere dagegen ist bakteriellen Ursprungs. Zur vollständigen Verhinderung der Nachsäuerung muß also das Blut steril und mit NaF versetzt aufbewahrt werden. Zugabe von NaF allein genügt aber, um die Reaktion des nach unserer Methode verdünnten und verschlossenen Blutes für 2 bis 3 Stunden bei Zimmertemperatur, oder für 12 bis 24 Stunden im Eiskasten (je nach der dort herrschenden Temperatur) unverändert zu erhalten.

Bei Untersuchungen mit nicht bei Zimmertemperatur aufbewahrtem Blute muß das Blut *vor dem Abzentrifugieren* auf Zimmertemperatur gebracht und durchgeschüttelt werden, um den Einfluß der verschiedenen Temperatur auf die H˙-Zahl auszuschalten.

Zugabe von NaF an und für sich verändert nicht die Reaktion des Blutes. Die von *Evans*[1]) gefundene Reduktion des Bindungsvermögens um etwa 0,9 Vol.-Proz. pro 0,1 Proz. NaF ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß das im Handel befindliche NaF — so auch das von uns benutzte von *Merck* — sauer reagiert (Verunreinigung, Zersetzung?); die mit NaF versetzte Verdünnungsflüssigkeit muß also bei der Zubereitung mit nicht unerheblichen Mengen Na(OH) neutralisiert werden.

(Wir machen darauf aufmerksam, daß die zugegebene Lauge nur langsam neutralisiert wird und deshalb die bei Zugabe von Lauge zu Beginn der Neutralisation auftretende alkalische Reaktion in 1 bis 2 Minuten wieder verschwindet; diese Erscheinung dauert so lange, bis die Lösung nicht definitiv neutral wird.)

Dem Gehalt von 0,1 Proz. NaF entsprechend muß die Verdünnungsflüssigkeit 0,14 Proz. weniger NaCl enthalten, damit sie nicht hypertonisch wird.

Bei unserer Methode wird die eigentliche Bestimmung der H˙-Zahl so ausgeführt, daß das verdünnte und mit Indikator versetzte Plasma in zwei Röhrchen geteilt wird, deren eines außerdem 0,5 ccm Phosphatlösung enthält; dieses Röhrchen wird mit n/100 HCl bis zur Farbengleichheit beider Röhrchen titriert. Das andere (Vergleichs- oder Plasma-) Röhrchen wird zur Volumenkorrektion mit 1 ccm CO_2-freier Verdünnungsflüssigkeit versetzt. *Zu diesem Zwecke soll eine fluorfreie Lösung, also unsere ursprüngliche Verdünnungsflüssigkeit benutzt werden.* Denn das stark verdünnte Plasma hat nur eine sehr schwache Pufferung und also eine labile Reaktion, die durch eine nicht ganz neutrale Zutat leicht beeinflußt wird; die Neutra-

[1]) Journ. of Physiol. 56.

lität der künstlich neutralisierten fluorhaltigen Lösung ist aber nicht so verläßlich wie die einer reinen NaCl-Lösung.

Die Nachsäuerung ist aber nicht die einzige Erscheinung, die die Reaktion des aufbewahrten Blutes verändern kann. In vielen Blutproben — speziell aber in solchen, in denen für eine Verhinderung der Nachsäuerung gesorgt wurde — konnten wir mit der Zeit eine alkalische Verschiebung der Blutreaktion konstatieren, und zwar unabhängig davon, ob das Blut nativ, steril, mit oder ohne NaF, auf Eis oder bei 37° C aufbewahrt wurde. Die Ursache dieser Erscheinung — auf die unseres Wissens bisher noch nicht aufmerksam gemacht wurde — liegt offenbar darin, daß das Oxyhämoglobin des Blutes teils durch bakterielle Zersetzung, teils aber durch die Sauerstoffzehrung des Blutes selbst, reduziert und teilweise in Methämoglobin umgewandelt wird (*Hári*)[1]) und das Hämoglobin eine schwächere Säure ist als das Oxyhämoglobin. Diese Reduktion läßt sich an der Farbe des aufbewahrten Blutes ohne weiteres erkennen.

Die Reduktion des Blutes bleibt für 24 Stunden aus, wenn zur Verdünnung des Blutes eine mit O_2 gesättigte Verdünnungsflüssigkeit benutzt wird und dadurch für eine O_2-Reserve gesorgt wird, und wenn das Blut auf Eis gehalten wird.

Um also mit unserer Methode zur Bestimmung der Wasserstoffzahl des Blutes genaue und verläßliche Werte zu erhalten, muß das Blut entweder sofort verarbeitet werden oder aber es muß die Verdünnungsflüssigkeit 0,1 Proz. NaF enthalten. Soll das Blut länger als 3 Stunden aufbewahrt werden, so muß es auf Eis liegen und mit O_2-gesättigter Flüssigkeit verdünnt werden.

Es ist uns nicht gelungen, ein Mittel zu finden, dessen Zugabe die Sterilität des verdünnten Blutes garantieren könnte. Die meisten Desinfizientien kommen *ab ovo* nicht in Betracht, entweder weil sie die Reaktion oder die Pufferung des Blutes verändern, weil sie hämolysieren, oder weil sie den Indikator aus der Lösung entfernen. Der von *Sander*[2]) empfohlene Zusatz von 0,01 Proz. Thymol hat sich in unseren Versuchen zur Sicherung der Sterilität bei Zimmertemperatur nicht immer als zureichend erwiesen.

Als einzige Möglichkeit bliebe das Auskochen der mit Indikator versetzten Verdünnungsflüssigkeit. Besonders bequem ist diese Manipulation nicht zu nennen; man muß für Korrektion der während des Kochens gestörten osmotischen Konzentration sorgen, für Vermeidung der CO_2-Aufnahme während des Auskühlens und später, was nicht ganz so leicht ist; das Unangenehmste ist aber, daß beim Kochen, speziell einer NaF enthaltenden Lösung, selbst in Jenaer Glas, nicht

[1]) Diese Zeitschr. 82.
[2]) Journ. of biol. Chem. 58.

unbedeutende Mengen Silikate aus dem Glase ausgelöst werden können, wodurch die Verdünnungsflüssigkeit eine unerwünschte Pufferung erhält; dadurch leidet aber die Empfindlichkeit der p_H-Bestimmung. Auch ist die ausgekochte Flüssigkeit O_2-frei und also zur Verhinderung der Nachreduktion des Blutes ungeeignet; durch eine nachträgliche Oxygenisation wird aber die Sterilität sehr problematisch. Wir möchten also die Sterilisation durch Auskochen, wenn wir sie auch in diesen unseren Versuchen — wo es auf absolute Zahlen weniger ankam — *faute de mieux* benutzt haben, zum allgemeinen Gebrauch nicht empfehlen.

Wir haben in einer früheren Arbeit[1]) gezeigt, daß durch Verdünnung mit O_2-gesättigter Lösung das Venenblut vollständig arterialisiert wird und dadurch seine Reaktion im Durchschnitt um p_H 0,04 saurer wird; wir haben daher für Messungen, die in mit O_2-gesättigter (zur Austreibung der CO_2)-Flüssigkeit verdünntem Venenblut vorgenommen wurden, eine Korrektur von $+ p_H$ 0,04 vorgeschlagen. Wir möchten jetzt bemerken, daß dadurch in extremen Fällen, wenn nämlich das benutzte venöse Blut ungewöhnlich wenig O_2 enthält, Fehler entstehen können, indem durch die Oxydation des in ungewöhnlich großen Mengen vorhandenen Hämoglobins das Blut nicht um p_H 0,04, sondern eventuell um das Doppelte oder noch mehr saurer wird. In Fällen also, wo eine Anoxämie vermutet wird (Herzschwäche usw.), darf das Blut nicht mit O_2 gesättigt werden und kann also nicht längere Zeit aufbewahrt werden. Die Verdünnungsflüssigkeit wird in solchen Fällen — wie überhaupt — am besten durch Durchströmen mit N_2 (aus einer Bombe) von CO_2 befreit.

Die *einfachste* Art, um die Verdünnungsflüssigkeit von CO_2 zu befreien, ist die folgende: Man verschließt den Kolben mit der Verdünnungsflüssigkeit mit einem doppelt gebohrten Gummistöpsel und läßt durch die Wasserstrahlpumpe Luft durchsaugen, die vorher durch Passieren eines Natronkalkturms CO_2-frei gemacht wird. Die Röhre, die unten in die Flüssigkeit taucht, enthält zweckmäßig einen kleinen Endkolben mit feinen Löchern, damit die kohlensäurefreie Luft fein durchgemischt wird. Anstatt Wasserstrahlpumpe kann natürlich auch eine mit der Hand getriebene Druckpumpe aus Gummiballon, wie eine solche z. B. bei Blutdruckmessungen gebraucht wird, verwendet werden.

Die so behandelte Verdünnungsflüssigkeit ist natürlich nicht O_2-frei, sondern ist damit bis zu $^1/_5$ Atmosphäre gesättigt; sie enthält daher bei Zimmertemperatur $^3/_5 = 0,6$ Vol.-Proz. davon. Bei zehnfacher Verdünnung des Blutes kann also *maximum* eine 6 Vol.-Proz. O_2 entsprechende Menge Hämoglobin oxydiert werden. Der durchschnittliche Unterschied im O_2-Gehalt des *oxygenfreien* verdünnten und des *vollständig oxydierten* Venenblutes beträgt etwa 10 Vol.-Proz. Die Oxydation des Hämoglobins im Venenblute verschiebt die Reaktion des Blutes — wie wir gezeigt haben — im Durchschnitt um p_H 0,04; einer Oxydation mit 6 Vol.-Proz. O_2, die — wie an der Farbe zu erkennen ist — zur *vollständigen* Oxydation nicht ausreicht, wird also eine Säuerung um etwa p_H 0,02 entsprechen; das konnten wir auch empirisch bestätigen. Diese Korrektur muß zu den gemessenen Werten addiert werden; dieselbe wird durch eine vorhandene Anoxämie nicht beeinflußt, da mehr als 6 Vol.-Proz. O_2 zur Oxydation nicht zur

[1]) Diese Zeitschr. **145**.

a) Versuche bei 37° C.

Nr.	Frisch entnommenes Blut: mit NaF p_H	Frisch entnommenes Blut: ohne NaF p_H	Dasselbe Blut, aufbewahrt: steril, *ohne* NaF p_H	Dasselbe Blut, aufbewahrt: *nicht* steril, *mit* NaF p_H	Dasselbe Blut, aufbewahrt: steril, *mit* NaF p_H
2	7,63	7,62	nach 3 Stunden = 7,59	—	—
	—	—	„ 7 „ = 7,47, 7,49, 7,51	—	—
	—	—	„ 24 „ = 7,43	—	—
3	7,58	7,58	„ 3 „ = 7,47	—	—
	—	—	„ 7 „ = 7,37, 7,38, 7,42	—	—
	—	—	„ 24 „ = 7,20, 7,19, 7,26	—	—
8	7,58	7,59	—	nach 1 Stunde = 7,58	—
	—	—	—	„ 4 Stunden = 7,60	—
	—	—	—	„ 24 „ = 7,15, 7,21, 7,25	nach 24 Stunden = 7,63

b) Versuche bei Zimmertemperatur.

Nr.	Frisch entnommenes Blut: p_H	Frisch entnommenes Blut: p_H	Dasselbe Blut, aufbewahrt: p_H	Dasselbe Blut, aufbewahrt: *nicht* steril, *ohne* F p_H	Dasselbe Blut, aufbewahrt: nicht steril, mit NaF p_H
4	7,53	7,52	—	nach 3 Stunden = 7,46, 7,48, 7,50	—
5 (Morbus Basedowi)	7,56	—	—	—	nach 24 Stunden = 7,61
6 (Morbus Basedowi)	7,69	7,69	—	nach 3 Stunden = 7,64	„ 5 „ = 7,65
	—	—	—	—	„ 24 „ = 7,61

c) Versuche im Eiskasten.

Nr.	Frisch entnommenes Blut p_H	Dasselbe Blut aufbewahrt: nicht steril, ohne NaF p_H	Dasselbe Blut aufbewahrt: steril, ohne NaF p_H	Dasselbe Blut aufbewahrt: nicht steril, mit NaF p_H	Dasselbe Blut aufbewahrt: steril, mit NaF p_H
9	7,56	—	nach 24 Stunden = 7,64	nach 24 Stunden = 7,59	nach 24 Stunden = 7,60
10	7,54	nach 24 Stunden = 7,48, 7,50	„ 24 „ = 7,62	„ 24 „ = 7,55, 7,57, 7,59	„ 24 „ = 7,62
11	7,62	—	„ 3 „ = 7,61	—	—
	—	—	„ 7 „ = 7,62	—	—
	—	—	„ 24 „ = 7,58	—	—
13	7,59	—	—	nach 24 Stunden = 7,57	nach 24 Stunden = 7,61

Versuche mit O_2-gesättigt verdünntem Blute.

Nr.	Sofort bestimmt p_H	Mit NaF, nicht steril, auf Eis gehalten p_H
[illegible]	[illegible]	nach 24 Stunden [illegible]

Verfügung stehen; und auch bei abnorm *hohem* O_2-Gehalt des Venenblutes kann der Fehler bei Anwendung dieser Korrektur wohl kaum mehr als p_H 0,01 betragen.

Versuchsbeispiele.

Das Blut-p_H wurde gewöhnlich als Mittelwert aus drei Kontrollbestimmungen berechnet. Dei drei Kontrollen stimmen regelmäßig bis auf p_H 0,02 überein. Wo infolge unregelmäßiger Nachsäuerung die drei Kontrollen verschiedene Werte gezeigt haben, dort wurde der Wert jeder Röhre einzeln angegeben. In den steril durchgeführten Versuchen wurden die Zentrifugierröhrchen, das Gummi und die Klammer ausgekocht; auch die Verdünnungsflüssigkeit wurde ausgekocht und noch heiß verschlossen. Durch das Kochen wird die Verdünnungsflüssigkeit O_2-frei; da die Oxydation des Hämoglobins durch Verdünnung mit O_2-gesättigter Verdünnungsflüssigkeit an und für sich zu einer geringen Ansäuerung des Blutes führt (siehe *Holló* und *Weisz*), so haben wir zu *allen* Röhrchen O_2-frei ausgekochte Verdünnungsflüssigkeit benutzt. Die angestrebte Sterilität wurde am Ende des Versuchs durch Impfen auf Agarröhrchen kontrolliert. Wir haben immer mit menschlichem Venenblut gearbeit. Die angegebene Blutreaktion gilt für 18° C.

Zusammenfassung.

Verschlossen gehaltenes Blut wird mit der Zeit gewöhnlich saurer. Diese Nachsäuerung hat zumindest zwei Ursachen: 1. Die Glykolyse, die durch Zusatz von 0,1 Proz. NaF verhindert werden kann (*Evans*), 2. bakterielle Zersetzung. Die Geschwindigkeit der Nachsäuerung hängt in erster Linie von der Temperatur ab; bei Zimmertemperatur kann die Zunahme der Wasserstoffzahl des Blutes in 2 bis 3 Stunden 10 bis 15 Proz. betragen, bei Bruttemperatur 25 bis 35 Proz. Bei Zusatz von NaF und auf Eis kann die Nachsäuerung auch ohne sterile Kautelen 12 bis 24 Stunden unmerklich bleiben; bei Zimmertemperatur nur 2 bis 3 Stunden lang.

Bei Ausschaltung der Nachsäuerung tritt eine Alkalisation des aufbewahrten Blutes zutage; sie ist auf eine Reduktion des Oxyhämoglobins durch Fäulnis, aber *auch durch Selbstzehrung* zurückzuführen. Sie läßt sich auf Eis und durch Übersättigung des Blutes mit O_2 bei der Verdünnung vermeiden.

Die Verdünnung des Blutes mit O_2-gesättigter Verdünnungsflüssigkeit — zur Austreibung der Kohlensäure — führt bei Anoxämie zu fehlerhaften Resultaten, die durch unsere frühere, für normales Blut angegebene Korrektur nicht ausgeglichen werden. Die einfachste Art der Austreibung der CO_2, mit *CO_2-freier Luft*, wird beschrieben; sie führt auch bei Anoxämie zu brauchbaren Resultaten.

Die Vernachlässigung dieser Kautelen mahnt bei der Verwertung mancher Angaben der Literatur — speziell aber von Wasserstoffzahlbestimmungen bei Körpertemperatur — zu großer Vorsicht.

Unsere eigenen bisher mitgeteilten Bestimmungen der Wasserstoffzahl des Blutes sind alle sofort nach Blutentnahme und bei Zimmertemperatur durchgeführt worden.

Über die Energiequelle bei der Muskelarbeit.

Eine Antwort an *Graham Lusk*[1]).

Von

Otto Meyerhof.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 24. März 1925.)

Die Schlußfolgerungen, die ich aus meinen Untersuchungen über die chemischen und energetischen Vorgänge bei der Kontraktion des isolierten Kaltblütermuskels in Verbindung mit den myothermischen Ergebnissen von Herrn *Hill* gezogen habe, sind so oft in zusammenfassenden Darlegungen ausgesprochen[2]), daß es überflüssig erschiene, sie zu wiederholen, wenn sie nicht mehrfach zu Mißdeutungen geführt hätten, von denen eine ganze Anzahl in dem unter gleichem Titel erschienenen Aufsatz von *Graham Lusk* enthalten ist.

Die Milchsäure entsteht, wie ich zeigen konnte, in der Ermüdungsphase des Muskels aus einer äquivalenten Umwandlung des Glykogens. Diese Tatsache ist übrigens nicht, wie *Lusk* angibt, von Herrn *Hill* gefunden („es soll daran erinnert werden, daß *Hill* mit einer wunderbaren Exaktheit gezeigt hat, daß der einleitende Prozeß bei der Kontraktion ein vollkommen nicht oxydativer ist und in der Bildung von Milchsäure aus Glykogen besteht“). Denn *Hill* vertrat früher die Meinung, daß die Milchsäure nicht aus Kohlehydrat abstammen könnte, sondern aus einem Körper von erheblich größerer Verbrennungswärme[3]), und er hat erst auf Grund meiner chemischen Untersuchungen diese Vorstellung aufgegeben. In der Erholungsperiode verschwindet nun die Milchsäure unter Aufwand einer Menge Sauerstoff, die nicht entfernt

---

[1]) Diese Zeitschr. **156**, 334, 1925.

[2]) *Asher-Spiro*, Ergebn. d. Physiol. **22**, 328, 1923. Les Prix Nobel. Stockholm 1924, abgedruckt Naturwissenschaften 1924, H. 10. Chemical Dynamics of Life Phaenomena, S. 61. Lippincott 1924. Jahresber. über d. ges. Physiol. 1922, S. 309, und anderes mehr.

[3]) *A. V. Hill*, Asher-Spiros Ergebn. d. Physiol. **15**, 340, 1916; insbesondere S. 371 ff.; siehe auch Physiol. Reviews **2**, 336 und 337, 1922.

ausreicht, um diese Milchsäure zu oxydieren. Es entsteht dafür eine äquivalente Menge Glykogen. Ein Bruchteil, der genau dem Aufwand an Sauerstoff entspricht, findet sich nicht als Glykogen wieder, und in sämtlichen meiner Arbeiten ist wegen der bilanzmäßigen Übereinstimmung in beiden Fällen die Frage als unentschieden hingestellt, ob dieser Bruchteil selbst verbrennt oder nicht vielmehr eine entsprechende Menge Kohlehydrat. Höchstens der Einfachheit halber ist bald die eine, bald die andere Formulierung an erster Stelle genannt worden. Daß aber eine dieser beiden Möglichkeiten bei der Arbeitsleistung des isolierten Kaltblütermuskels regelmäßig verwirklicht ist, geht sowohl aus der genauen Übereinstimmung der verschwindenden Menge Milchsäure mit der als Glykogen wiedergefundenen + dem aus dem Sauerstoffverbrauch berechneten oxydierten Anteil hervor, wie andererseits aus dem respiratorischen Quotienten der Erholungsperiode, der stets genau gleich 1 ist[1]). Um im Anschluß an diese Feststellungen die von mir kalorimetrisch bestimmte Wärme deuten und mit den myothermisehen Messungen von *Hill* und den späteren von *Hartree* und *Hill* vergleichen zu können, wurde eine stöchiometrische Formulierung gewählt, die stets als Idealisierung bezeichnet ist, die aber mit vollem Erfolg dazu gedient hat, die in den einzelnen Phasen der Muskelkontraktion auftretenden Wärmebeträge, insbesondere die von *Hill* entdeckte verzögerte Wärmebildung in ihrem Ablauf und ihrer Größe zu erklären. Bei Erwähnung dieses Tatbestandes verwechselt *Graham Lusk*, falls hier nicht ein Übersetzungsfehler vorliegt, wiederholt die oxydative Erholungswärme mit der Erschlaffungswärme, welch letztere in die Initialphase der Kontraktion fällt, während die Erholungswärme mit der Erschlaffung nichts zu tun hat. Noch bedeutsamer aber ist das Mißverständnis, daß er den nichts präjudizierenden Ausdruck: das oxydative Verschwinden der Milchsäure in der Erholungsperiode (oxydative removal in der Ausdrucksweise von *Hill*) als Behauptung der Verbrennung der Milchsäure auffaßt, während doch der oben dargestellte komplexe Vorgang damit gemeint ist, und es infolgedessen als eine anfechtbare Äußerung von mir hält, „daß *Hill* mit Recht schon frühzeitig die verzögerte Wärmebildung mit dem oxydativen Verschwinden der Milchsäure in Verbindung gebracht hätte". In der Tat wird niemand, der diese Äußerung richtig versteht, ihre Wahrheit bezweifeln können.

Zusammengefaßt besteht also nach meiner Meinung ein Kreislauf des Kohlehydrats im Muskel. In der ersten Phase entsteht freiwillig Milchsäure aus Glykogen, in der zweiten Phase wandelt sich unter Aufwand von Oxydationsenergie die Milchsäure in Glykogen zurück.

---

[1]) Pflügers Arch. f. Physiol. **175**, 88, 1919; **182**, 284, insbesondere 312, 1920; **185**, 11, insbesondere 21ff., 1920.

Auch ich neige mehr zu der Ansicht, daß die Milchsäure selbst nicht verbrennt, sondern eher das Kohlehydrat, und zwar auf einem anderen Wege als über Milchsäure. Jedenfalls stammt im isolierten Kaltblütermuskel die Oxydationsenergie der Erholungsperiode letzten Endes aus Kohlehydrat.

Dabei ist aber die prinzipielle Möglichkeit, daß in von mir nicht untersuchten Fällen, z. B. im Muskel des diabetischen Warmblüters, die Oxydationsenergie aus anderem Material als Kohlehydrat, etwa aus Fett, stammen könnte, nicht ausgeschlossen. Der übergeordnete Gesichtspunkt ist der energetische, indem die Oxydationsenergie den gesamten Kreislauf der Milchsäure unterhält. Auch ist eine solche Möglichkeit keineswegs von mir übersehen oder geleugnet; ja, die Arbeit mit *H. E. Himwich* über den Kohlehydratstoffwechsel des Rattenmuskels bei einseitiger Fetternährung, die von *Graham Lusk* zitiert ist, ist im Hinblick auf dieses Problem unternommen, und die eine der beiden darin gestellten Fragen lautet: „Kann die Energie, die für die Resynthese der Milchsäure zu Glykogen erfordert wird, auch aus der Oxydation anderer Verbindungen als Kohlehydrat stammen?“[1]). Doch ließ sich diese Frage am isolierten Muskel der fetternährten Ratte nicht bestimmt entscheiden, obwohl es auffiel, daß der respiratorische Quotient des isolierten Muskels auch hier nahe bei 1 lag. Wir konnten daher nichts anderes als den Schluß ziehen: „Bestimmte Anhaltspunkte haben sich danach nicht ergeben, daß der (isolierte) Muskel einseitig fetternährter Ratten Fett an Stelle von Kohlehydrat verbrennen kann. Jedoch ist auch das Gegenteil nicht streng bewiesen worden.“ Niemals ist aber weder hier noch an anderer Stelle von mir die Möglichkeit einer Umwandlung von Fettsäure in Milchsäure behauptet, von der *Graham Lusk* spricht, sondern als unmittelbare Quelle der Milchsäure im Muskel ist ausschließlich Kohlehydrat angenommen. In einer gleichzeitig erschienenen Mitteilung zeigten *Burn* und *Dale*[2]) an dem mit zuckerhaltigem Blut durchströmten Muskelpräparat der Katze, daß es den respiratorischen Quotienten von 1 hat, selbst am diabetischen Tiere.

Schließlich fanden am ganzen Menschen, also in einer Versuchsanordnung, die *Graham Lusk* für entscheidender hält als die am isolierten Organ, *Hill* und seine Mitarbeiter, daß der respiratorische Quotient bei einer kurzen und kräftigen Muskelanstrengung im ganzen Zyklus der Arbeits- und Erholungsperiode genau gleich 1 ist, selbst bei einseitiger Fetternährung[3]). Es liegt daher nahe, daß die verschiedenen mit dem Studium des Muskelstoffwechsels beschäftigten Autoren,

---

[1]) *Otto Meyerhof* und *H. E. Himwich*, Pflügers Arch. **205**, 416, 1924.
[2]) Journ. of Physiol. **59**, 164, insbesondere 186—188, 1924.
[3]) Proc. Roy. Soc. B. **97**, 155, insbesondere 175, Anmerkung, 1924.

ebenso wie es auch *Krogh* und *Lindhard* tun[1]), die Vorstellung bevorzugen, daß das Fett zuvor in Kohlehydrat umgewandelt wird, ehe es im Muskel verbraucht wird, ohne indes die andere Möglichkeit, daß das Fett direkt verbrennen könnte, vollständig abzulehnen.

Ich selbst habe hierzu dieselbe Stellung eingenommen und insbesondere in meinen englischen Vorlesungen *Graham Lusks* ablehnende Stellung zu der ersten der beiden Möglichkeiten betont[2]). Wenn, wie *Lusk* angibt, ein hungernder Hund bei Fehlen von Kohlehydrat Arbeit mit demselben Nutzeffekten der Oxydation leisten kann wie bei Kohlehydratzufuhr[3]), so spricht dies allerdings zugunsten einer direkten Fettverbrennung, falls die Energie nicht durch Eiweißzersetzung gedeckt werden kann und der Wirkungsgrad des Muskels in beiden Fällen annähernd maximal ist. Ohne dieses wird man einem so komplexen Versuch allein keine durchschlagende Beweiskraft zuerkennen können. *Lusks* Standpunkt wird ja von der Ernährungsphysiologie nicht allgemein geteilt. Die entgegengesetzte Ansicht vertritt unter anderen *Geelmuyden*, der die Umwandlung von Fett in Kohlehydrat im Tierkörper als erwiesen erachtet[4]). Da es sich hier um ein von dem meinigen entferntes Arbeitsgebiet handelt, muß ich den Ernährungsphysiologen die Entscheidung der Streitfrage überlassen.

Auch in einer neuen Arbeit mit *K. Lohmann* ist von mir gezeigt, daß der isolierte ruhende Warmblütermuskel zwar in reiner Salzlösung neben Kohlehydrat auch Eiweiß und wahrscheinlich auch Fett verbrennt, besonders bei Hungertieren, daß dagegen in einer Lösung, deren Zuckergehalt dem des Blutes entspricht, die auf Eiweißverbrennung zu beziehende Ammoniakabspaltung fast ganz unterbleibt und der Sauerstoffverbrauch durch Zuckerschwund gedeckt ist[5]). Der lebende Muskel wird aber ja unter allen Umständen mit Blutzucker versorgt. Sollte jedoch wirklich den höheren Tieren die den Pflanzen sicher zukommende Fähigkeit der Umwandlung von Fett in Zucker fehlen, und sollte sich beweisen lassen, daß Fett im Muskel direkt die Oxydationsenergie für die Arbeit liefern kann, so wird der Kernpunkt meiner Feststellungen dadurch nicht berührt. Nach diesen wird der Kreislauf der Milchsäure durch die Oxydationsenergie unterhalten. Die Energiebilanz ließ sich für den isolierten Kaltblütermuskel auf Grund der nachweislichen ausschließlichen Oxydation von Kohlehydrat vollständig feststellen. Damit konnte die Erklärung für den beobachteten Verlauf und Umfang der Kontraktionswärme quantitativ genau gefunden

---

[1]) Biochem. Journ. **14**, 290, insbesondere 345ff., 1920.
[2]) Chemical Dynamics of Life Phaenomena, S. 84.
[3]) *Lusk* und *Andersen*, Journ. biol. Chem. **82**, 421, 1917.
[4]) Asher-Spiros Ergebn. d. ges. Physiol. **22**, 51, 1923.
[5]) Noch nicht veröffentlicht.

werden. Daß das Eiweiß im Muskel den Weg über Kohlehydrat nehmen kann, ist durch die letztveröffentlichte Arbeit[1]) mindestens wahrscheinlich geworden. Es bleibt dann noch übrig, die Energiebilanz für den besonderen Fall der Fettverbrennung festzustellen, sobald im isolierten Organ dieser Mechanismus einwandfrei und reproduzierbar dargetan worden ist. Dies jedoch erscheint mir als Voraussetzung für die exakte Forschung auf unserem Gebiet und als Bedingung für den wissenschaftlichen Fortschritt überhaupt.

Graham Lusk schließt seine Polemik mit der Äußerung, „daß es unsicher ist, Schlüsse aus Versuchen am isolierten Gewebe zu ziehen, ohne über eine fundamentale Kenntnis der hauptsächlichsten Grundsätze des Energiestoffwechsels zu verfügen". Diejenigen, die die umfangreiche Literatur über das von *Lusk* behandelte Problem einer etwaigen Umwandlung von Fett in Kohlehydrat studieren, werden geneigt sein, den Satz umzukehren und einen Schluß aus dem komplexen Geschehen des gesamten Organismus auf die Vorgänge in den einzelnen Organen oder Geweben für um vieles unsicherer halten. In der Tat würde sich ja unsere Wissenschaft in einer eigenartigen Lage befinden, wenn man von ihr all dasjenige fortnehmen wollte, was aus Versuchen am isolierten Organ oder Gewebe wie dem Muskel erschlossen worden ist.

---

[1]) *Otto Meyerhof*, *K. Lohmann* und *R. Meier*, diese Zeitschr. **157**, 459, 1925.

Über die Pilzstärke (Amylose) bei Aspergillus niger v. Tgh. und einige Bemerkungen über ihren diastatischen Abbau.

Von

Dorothea Schmidt.

(Aus dem Institut für landwirtschaftliche Bakteriologie der Universität Göttingen.)

(Eingegangen am 25. März 1925.)

Mit 2 Abbildungen im Text.

Inhaltsverzeichnis.

I. Einleitung.

In verschiedenen Pilzen und Bakterien sind Polysaccharide gefunden worden, die sich mit Jod blau färben können. In einigen Fällen sind es ausgesprochene Reservestoffe, in anderen ist ihre physiologische Bedeutung noch umstritten. Über ihre chemische Zusammensetzung ist sehr wenig bekannt. Bei folgenden Arten ist eine solche Substanz nachgewiesen worden:

Boletus pachypus[1]), Dematium[2]), Aspergillus niger[2]), Aspergillus oryzae[2]), Aspergillus fumigatus[2]), Aspergillus glaucus[2]), Penicillium, mehrere Arten[2]), Citromyces[2]), Beggiatoa mirabilis[3]), Thiosphaerella amylifera[3]), Spirillum amyliferum[4]), Bacillus amylobacter[5]), Bacillus esterificans[6]), Pseudomonas trifolii[6]), Bacterium coli[7]), Bacterium xylinum, Bacterium pasteurianum, Bacterium kützingianum[8]); (bei diesen letzten drei Arten handelt es sich um Hemicellulosen, die in der Zellwand und im

---

[1]) *Bourquelot* 1891, siehe *J. Zellner*, Chemie der höheren Pilze. Leipzig 1907.

[2]) *Lindner*, *Tanret*, *Wehmer*, *Boas*, siehe *F. Boas*, Beih. z. Botan. Centralbl., Abt. I, **36**, 135, 1919.

[3]) Nach *A. Janke*, Allgem. Techn. Mikrobiologie. Dresden und Leipzig 1924.

[4]) *van Tieghem*, Bull. Soc. botan. de Fr. **26**, 65, 1879.

[5]) Unter anderen *G. Bredemann*, Centralbl. f. Bakt., II, **23**, 385, 1909.

[6]) *H. Huss*, ebendaselbst, II, **19**, 50, 1907.

[7]) *E. Ch. Grey*, Biochem. Journ. **18**, 712, 1924.

[8]) *Hansen*, Meddelelser fra Carlsberg Laboratoriet **3**, 1894.

Schleim vorkommen). Auch eine von verschimmeltem Brot isolierte Rhizopusart konnte ich durch geeignete Ernährungsbedingungen (20 Proz. Saccharose, 0,5 Proz. NH_4NO_3, 0,25 Proz. KH_2PO_4, 0,125 Proz. $MgSO_4$) zur Bildung eines solchen Stoffes veranlassen. Es ist anzunehmen, daß die Fähigkeit dazu noch weiter verbreitet ist. Auf den Zusammenhang der bei den Pilzen gefundenen Substanz mit dem Isolichenin der Flechten werde ich noch später eingehen.

In den letzten Jahren haben *F. Boas*[1]) und *H. Lappalainen*[2]) ausführlich über diesen Gegenstand gearbeitet. Der Versuchspilz war bei *H. Lappalainen* immer, bei *F. Boas* meistens Aspergillus niger *van Tieghem*. Bei beiden findet sich eine Zusammenstellung der älteren Literatur darüber. Die wichtigsten Ergebnisse von *Boas* sind diese: Die Substanz ist in der Zellmembran und in der Nährlösung nachzuweisen. Sie färbt sich wie Stärke in der Kälte blau, in der Wärme nicht mit Jod; nach Behandlung mit Diastase oder kochender verdünnter Säure unterbleibt diese Reaktion, und *Fehling*sche Lösung wird reduziert; in Kalilauge quillt die Substanz auf, die Jodreaktion aber ist auch nach Kochen mit KOH unverändert. $[\alpha]_D = +120$ bis 160^0. Sie ist in Wasser leicht löslich und wird durch Alkohol ausgefällt. Sie entsteht nur als ein pathologisches Produkt bei starker Azidität der Nährlösung, was auf Säurelähmung der Pilzdiastase beruhen soll, und soll abgebaut werden, sobald durch Abnahme der Azidität die Diastase wieder wirksam wird. Zu ihrem Aufbau können ganz verschiedene Zucker, mehrwertige Alkohole und organische Säuren als Kohlenstoffquelle Verwendung finden, am günstigsten aber ist Saccharose. Die Sonderstellung der Saccharose soll mit besonders geringer Diastasebildung beim Wachstum auf diesem Zucker zusammenhängen.

H. Lappalainen stellte fest, daß die Pilzstärke[3]) zuerst in der Membran gebildet, dann zum Teil in die Nährlösung abgegeben wird; das soll unter günstigen Wachstumsbedingungen normalerweise eintreten. Die Substanz soll die Funktion eines Membranstoffs und gleichzeitig eines Reservestoffs ausüben. Die Verfasserin bestätigt die besonders günstige Wirkung der Saccharose auf die Pilzstärkebildung und bringt eine Reihe von Beobachtungen über den Einfluß der Temperatur und der Konzentration der Nährstoffe, auf die ich später eingehen werde.

II. Physiologie der Pilzstärke.

Qualität der Kohlenstoffquelle. Auch ich habe ausschließlich mit Aspergillus niger gearbeitet. Meine erste Aufgabe war die weitere Aufklärung der Bedingungen für die Entstehung der Pilzstärke. Die zunächst liegende Frage war: Ist die günstige Wirkung der Saccharose auf eine Synthese des Polysaccharids direkt aus diesem Disaccharid zurückzuführen, oder ist die Wirkung indirekt? Letztere Annahme

---

[1]) *F. Boas*, diese Zeitschr. **78**, 308, 1917; **81**, 80, 1917; Ber. d. deutsch. botan. Ges. **37**, 50, 1919; Beih. z. Botan. Centralbl., Abt. I, **36**, 135, 1919; Centralbl. f. Bakt. II, **56**, 7, 1922.

[2]) *H. Lappalainen*, Biochemische Studien an Aspergillus niger. Helsingfors 1919.

[3]) Ich wähle diesen Trivialnamen im Anschluß an *Lappalainen*, da der Ausdruck „lösliche Stärke", den *Boas* gebraucht, im allgemeinen ein anderes Produkt bezeichnet, das nicht mit Pilzstärke identisch ist.

erwies sich als richtig, und zwar kommt die Förderung in erster Linie darum zustande, weil aus diesem Zucker besonders viel Säure gebildet wird[1]). Wie schon *Boas* zeigte, ist Rohrzucker in seiner Wirkung auf die Pilzstärkebildung nicht durch Invertzucker zu ersetzen. Auch der Säuregrad ist größer bei Kulturen, die auf Saccharose gewachsen sind, als bei solchen auf einem Gemisch von Glucose und Fructose in äquivalenter Menge; das geht sowohl aus meinen (unten mitgeteilten) Versuchen hervor wie aus denen von *M. Molliard*[2]), von denen ich erst nachträglich Kenntnis erhielt. *Molliard* führt diese Erscheinung auf die dem Rohrzucker beigemengten Verunreinigungen zurück; über deren chemische Natur sagt er nichts aus, so daß der Zusammenhang mit der Säurebildung unklar bleibt. Mir scheint die Annahme näher zu liegen, daß der unbeständige Sauerstoffring im Fructoseanteil der Saccharose[3]) dafür ausschlaggebend ist, der ja dieses Disaccharid auch sonst besonders reaktionsfähig macht. Ich möchte diesen Vorgang der Säurebildung in Parallele setzen zu der Bildung von Acetaldehyd[4]) im Gewebebrei, der nach *Neuberg* und *Gottschalk* aus Glykogen drei- bis fünfmal so stark ist wie aus Glucose, was *Kuhn*[5]) auf die verschiedenartige Lage der Sauerstoffringe in den beiden Verbindungen zurückführt.

Bei den folgenden Versuchen wurde nur die potentielle, nicht die aktuelle Säure bestimmt; diese Messung genügt, da es sich meist um starke Säuren handelte, und da es ja nur auf Vergleichswerte, nicht auf eine absolute Ermittlung der $H^{\cdot}$-Konzentration ankam. Als Indikator wurde Phenolphthalein gewählt, dessen Farbumschlag nicht wesentlich durch den vom Pilz produzierten gelben Farbstoff gestört wird. Die Jodreaktion wurde immer makroskopisch an einem mit der Platinnadel entnommenen Stück Mycel auf einem Uhrglase mit n/100 Jodlösung geprüft. Sie tritt nicht immer momentan ein; wahrscheinlich tut sie es nur, wenn die Pilzstärke sich auf der Außenfläche der Zellwand befindet.

Versuch: Vier Kulturen wurden in Erlenmeyerkolben von je 300 ccm Inhalt mit 50 ccm Nährlösung angesetzt, die 0,5 Proz. NH_4NO_3, 0,25 Proz. KH_2PO_4, 0,125 Proz. $MgSO_4$ in destilliertem Wasser aufgelöst[6]) enthielt. Außerdem bekamen zwei der Kolben 5,7 Proz. Saccharose, die beiden anderen in äquivalenter (auf Invertzucker berechneter) Menge — je 3 Proz. — Glucose und Fructose. Temperatur 30°. Ein Paar Kulturen wurde 3 Tage, das andere 5 Tage nach der Impfung geerntet.

---

1) Außerdem vielleicht durch geringere Diastasebildung (Boas).
2) *M. Molliard*, C. r. **178**, 161, 1924.
3) Vgl. *M. Bergmann*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **56**, 1227, 1923.
4) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **146**, 164, 1924.
5) *R. Kuhn*, ebendaselbst **57**, 1965, 1924.
6) Soweit nichts anderes bemerkt ist, wurden die Mineralsalze immer in dieser von *H. Lappalainen* angegebenen Mischung angewandt.

	Mycelentwicklung	Jodfärbung	10 ccm Nährlösung neutralisieren von n/30 NaOH ccm
3 Tage auf Saccharose	stark faltig, fest	stark blau	21,6
3 Tage auf Glucose + Fructose	schwach und weich	braun, Spuren blau	8,1
5 Tage auf Saccharose	bei beiden ziemlich gleichmäßig stark, faltig und fest	schmutzigblau	17,2
5 Tage auf Glucose + Fructose		braun	14,2

Die stärkere Säurebildung auf Saccharose tritt klar hervor, wenn auch bei der 5 Tage alten Kultur nicht so scharf wie bei der 3 Tage alten; vielleicht hat bei dieser schon der Rückgang der Azidität eingesetzt. Die größere Anhäufung von Pilzstärke in den Saccharosekulturen ist auch zu erkennen. Bewiesen wird die ausschlaggebende Bedeutung der Säurebildung aber erst durch das Ergebnis, das ich bei Säurezusatz erhielt:

Vier Kolben wurden vor der Sterilisation genau so beschickt wie im ersten Versuch, nachher aber bekamen sie je 0,4 ccm einer annähernd 10 n Schwefelsäure. Temperatur 30°.

	Mycelentwicklung	Jodfärbung
4 Tage auf Saccharose	kaum gekeimt	—
4 Tage auf Glucose + Fructose	schwach gewachsen, einzelne Inseln	Oberseite stark und rein blau
9 Tage auf Saccharose	nur eine der beiden Kulturen schwach gewachsen, eine kleine Insel	blau
9 Tage auf Glucose + Fructose	fast lückenlos über die ganze Oberfläche hin gewachsen	blauschwarz, Unterseite tiefer als bei der Saccharosekultur

Bei diesem starken Säurezusatz sind also die auf Glucose + Fructose gewachsenen reicher an Pilzstärke als die auf Saccharose gewachsenen Kulturen. Die Ursache liegt wahrscheinlich in der bei Saccharose eingetretenen Wachstumshemmung, die ja in der Tabelle deutlich zum Ausdruck kommt. Das Säuremaximum ist offenbar abhängig von der Art der Kohlenstoffquelle.

Versuch: Vier Kulturen wurden angesetzt auf 5 Proz. Glucose, Fructose, Lactose bzw. Glycerin, mit so viel H_2SO_4-Zusatz, daß die Nährlösung 0,12 säurenormal ist; die übrigen Bedingungen wie oben.

	Mycel am dritten Tage	Mycel am sechsten Tage	Jodfärbung am sechsten Tage
Glucose	am besten gewachsen, Inseln mit scharfem, wulstigem Rand	große Masse, stark faltig, einzelne Konidien	stark blau
Fructose	Inseln mit weniger scharfem Rand	etwas weniger Masse, faltig, keine Konidien	stark blau
Lactose	Inseln mit verschwommenem Rand	durchsichtig dünn, schleimig	braun
Glycerin	eben gekeimt	einzelne kleine, stark gewölbte Inseln	stark blau

Die braune Jodreaktion der Lactosekultur hängt mit ihrer weichen, schleimigen Beschaffenheit zusammen; Lactose ist ja bekanntlich für Aspergillus nicht oder nur (in saurer Lösung) schwer angreifbar. Nicht nur der Pilzstärkegehalt der Nährlösung, wie schon *H. Lappalainen* feststellte, sondern auch der des Mycels selbst tritt fast nur mit dessen starker, welliger Ausbildung zusammen auf.

Qualität und Quantität der Stickstoffquelle. Solche dünnen, weichen, pilzstärkefreien Kulturen erhält man oft, wenn man Pepton als einzige oder auch neben einer anderen Kohlenstoffquelle gibt; schon 1 Proz. Pepton neben 10 Proz. Rohrzucker genügt meistens, um die bei Rohrzucker gewöhnliche Entwicklung zu hemmen. Das hängt vielleicht mit der von *Euler*[1]) festgestellten Tatsache zusammen, daß Aspergillus niger bei Peptonzusatz zur Nährlösung besonders reichlich Diastase bildet. Die Bedeutung der Diastase für das Auftreten und Verschwinden der Pilzstärke hat *Boas* mehrfach hervorgehoben; ich komme noch einmal darauf zurück.

Bei Verwendung von Asparagin als Nährstoff bekam ich in bezug auf die Pilzstärkebildung ein ähnliches Ergebnis wie bei Pepton, der Habitus der Mycelien aber war immer kräftig, fest und faltig. Hier wurde auch untersucht, welche Rolle die Quantität der Zugabe spielt. Der Anlaß dazu war die Angabe von *H. Lappalainen*, eine bestimmte Größe des Quotienten Stickstoffkonzentration : Kohlenstoffkonzentration sei zur Pilzstärkebildung erforderlich.

Sieben Kulturen wurden angesetzt in Erlenmeyerkolben von 300 ccm Inhalt mit je 50 ccm Nährlösung. 5 Proz. Rohrzucker, 0,25 Proz. KH_2PO_4, 0,125 Proz. $MgSO_4$, in geometrischer Reihe ansteigende Mengen Asparagin: 0,156, 0,312, 0,625, 1,25, 2,5, 5, 10 Proz. Temperatur 27°. 2 Tage nach der Impfung bekam jede Kultur 1 ccm 20proz. H_2SO_4; am nächsten Tage reagierten die Mycelien der drei niedrigsten Konzentrationen stark blau mit Jod, das vierte noch

[1]) *H. v. Euler*, Chemie der Enzyme I, 296, München und Wiesbaden 1920.

einigermaßen, das fünfte sehr wenig, das sechste und siebente nur noch in Spuren. Daraufhin wurde noch eine Reihe unter denselben Bedingungen, nur ohne Säurezusatz, gezogen und im Alter von 3 Tagen geerntet. Alle Kulturen waren pilzstärkefrei. Die Mycelien wurden halbiert, je eine Hälfte 24 Stunden auf 0,7 n H_2SO_4 bei 30° gehalten, die andere bei 16° 15 Stunden auf 40 ccm 0,2proz. Lösung löslicher Stärke, der 1 ccm Toluol zugesetzt war. Dann wurde bei der ersten die Jodreaktion des Mycels, bei der zweiten die der Stärkelösung geprüft. Der Säuregehalt der Nährlösung wurde titrimetrisch bestimmt. Es ergab sich ein Absinken der Pilzstärkebildung, ein nicht ganz gleichmäßiges Ansteigen der Diastasewirksamkeit und der Azidität mit dem Ansteigen der vorher gegebenen Asparaginkonzentration.

Asparaginkonzentration Proz.	Verbrauch an n/30 NaOH auf 10 ccm der Nährlösung ccm	Jodreaktion der Stärkelösung	Jodreaktion des auf Säure übertragenen Mycels
0,312	17,8	rot	mehr blau als braun
0,625	52,5	violett	
1,25	22,3	violett	zu gleichen Teilen gemischt blau und braun
2,5	34,6	rotviolett	
5	43,1	rotviolett	mehr braun als blau
10	53,0	rot	

Es fällt auf, daß die Kulturen, die die meiste Säure bildeten, am wenigsten Pilzstärke produzierten.

Bei Verwendung von NH_4NO_3 ist das Gegenteil der Fall. Die qualitative Bedeutung von mineralsaurem Ammonium, die darin liegt, daß bei seiner Assimilation die Mineralsäure frei wird, ist schon durch *Boas* klargestellt worden. Ich fand mit Erhöhung der NH_4NO_3-Konzentration eine Abnahme der Mycelmasse, aber eine Steigerung der Pilzstärkebildung; das liegt offenbar an der stärkeren Säurebildung.

Versuch: Sechs Kulturen wurden angesetzt in Erlenmeyerkolben von 300 ccm Inhalt mit je 50 ccm Nährlösung. 10 Proz. Rohrzucker, 0,125 Proz. $MgSO_4$, 0,25 Proz. KH_2PO_4. Temperatur 20°.

NH_4NO_3-Konzentration	0,125 Proz.	0,25 Proz.	0,5 Proz.	1 Proz.	2 Proz.	4 Proz.
Jodreaktion im Alter von 5 Tagen	fast nur braun		blau und braun gemischt			stark blau

In einem Versuch mit KNO_3 erwies sich die Erhöhung des Quotienten Stickstoffkonzentration : Kohlenstoffkonzentration als belanglos für die Pilzstärkebildung. Um die verschiedene Höhe der Säurebildung möglichst auszuschalten, bekamen die Kulturen je 0,5 Proz. NH_4NO_3 wie sonst, außerdem aber KNO_3 in variierter Menge. Da in Gemischen verschiedener Stickstoffverbindungen nach *Boas* die Ammonsalze der Mineralsäuren immer bevorzugt werden, war eine wesentliche Änderung der Azidität bei einer Assimilation des KNO_3 (wenigstens in der ersten Zeit des Versuchs) nicht zu befürchten. Sechs Erlenmeyerkolben von 100 ccm

Inhalt bekamen je 25 ccm Nährlösung, 5 Proz. Rohrzucker, 0,25 Proz. KH_2PO_4, 0,125 Proz. $MgSO_4$. Temperatur 30°. 2 Tage nach der Impfung ist eine deutliche Abnahme der Mycelmasse mit Steigerung der Nitratkonzentration zu erkennen, wie im vorigen Versuch, außerdem aber eine Abnahme der Blaufärbung mit Jod.

KNO_3-Zusatz	—	0,5 Proz.	1 Proz.	2 Proz.	4 Proz.	8 Proz.
Jodreaktion	ziemlich blau	stark blau		weniger blau		Spur blau

Die geringere Pilzstärkebildung der hohen Konzentrationen ist hier auf das schwächere Wachstum zurückzuführen; denn bei längerer Versuchsdauer reagieren sämtliche Kulturen stark blau mit Jod, die letzte 12 Tage nach der Impfung. Die Mycelmasse der niedrigeren Konzentrationen wird hier allerdings nicht erreicht.

Überblickt man die Stickstoffversuche, so ist klar, daß diejenigen mit NH_4NO_3 allein lediglich in bezug auf die Säurewirkung des Anions anzusehen sind. Die Versuche mit gleichzeitigem Zusatz von KNO_3 neben NH_4NO_3 können weiterhin nicht allein vom Gesichtspunkt des reinen Stickstoffumsatzes betrachtet werden. Denn NH_4NO_3 ist für alle gleich; eine erhöhte Stickstoffverarbeitung bei der steigenden KNO_3-Menge müßte freies Alkali bilden, so daß das Bild nicht eindeutig wäre. Dagegen zeigen die Asparaginversuche, daß *Lappalainens* Anschauung zutreffend sein dürfte; denn bei gleicher anorganischer Säure war die Pilzstärkebildung mit sinkender Stickstoffversorgung größer, obwohl bei höherer Asparaginzufuhr die Bildung (organischer) Säuren ganz erheblich stärker war. Es scheint also, daß eine reichliche Stickstoffernährung (von der Anionensäurewirkung abgesehen) den Kohlehydratstoffwechsel zurückdrängt, der andererseits bei geringerer Stickstoffversorgung in den Vordergrund tritt und unter geeigneten Säurebedingungen zur Pilzstärkebildung führt. Allgemein kommt ja dem Stickstoff-Kohlehydratverhältnis eine äußerst wichtige Rolle bei den Stoffwechselvorgängen zu.

Quantität der Kohlenstoffquelle. Der Satz von *Waterman*[1]), daß Änderungen der Konzentration und Temperatur nur die Geschwindigkeit des Stoffwechselprozesses beeinflussen, ist nicht richtig. Noch deutlicher tritt das bei Variation der Kohlenstoffkonzentration hervor. *Waterman* gibt in zwei Arbeiten[2]) an, er habe Glykogen bei Aspergillus niger gefunden. Auf die Frage, ob es sich bei seinen Versuchen wirklich um Glykogen handelte, komme ich noch zurück. Jedenfalls bekam auch ich unter Anwendung seiner Versuchsbedingungen Mycelien, die sich mit Jod braun färbten; diese Jodreaktion habe ich ja auch sonst

[1]) *H. J. Waterman*, Folia Microbiologica I, 4, 422.
[2]) *Derselbe*, l. c. und Zeitschr. f. Gärungsphysiol. **3**, 1, 1913.

schon mehrfach erwähnt. *Watermans* Nährlösung hatte die Zusammensetzung: 2 Proz. Saccharose, 0,05 Proz. NH_4Cl, 0,05 Proz. KH_2PO_4, 0,02 Proz. $MgSO_4$, unterscheidet sich also von den von *Boas* und *Lappalainen* angewandten nur durch die Konzentration der Nährstoffe. Hier muß also der Grund liegen, weshalb *Waterman* niemals blaue, *Boas* niemals braune Jodreaktion erwähnt. In der Tat erhielt ich bei Variation der Zuckerkonzentration nur auf den mittleren Konzentrationen blaue, auf den unteren und oberen braune Jodreaktion.

Versuch: Sechs Erlenmeyerkolben von 100 ccm Inhalt, 25 ccm Nährlösung, Mineralsalze wie sonst, Temperatur 30°.

Saccharose-konzentration	1,25 Proz.	2,5 Proz.	5 Proz.	10 Proz.	20 Proz.	40 Proz.
Jodreaktion im Alter von 3 Tagen	fast rein braun	unten braun, oben blau	annähernd gleich, stark blau		gemischt, mehr braun	rein braun

Die mittleren Mycelien sind stark und wellig, die unteren und oberen schwächer, die oberen ganz glatt und weich. Zwischen 5 und 10 Proz. Saccharose liegt das Optimum. Hier ist das Wachstum so intensiv und die Ausbildung des Mycels so kräftig, wie sie unterhalb und oberhalb des Optimums auch bei einer Ausdehnung des Versuchs bis zum Eintritt deutlicher Autolyse nicht erreicht wird. Daß dies für die niedrigeren Konzentrationen gilt, liegt auf der Hand, weil hier schließlich Nährstofferschöpfung eintreten muß. Die Gültigkeit auch für die höheren Konzentrationen geht aus folgendem Versuch hervor:

Sieben Petrischalen von 9 cm Durchmesser mit je 50 ccm Nährlösung, Mineralsalze wie sonst, Rohrzuckerkonzentration variiert. Temperatur 30°. Impfung 2. Mai. Ergebnis in Tabellenform s. f. S.

Die quantitative und auch die qualitative Entwicklung (die Natur des gebildeten Polysaccharids) ist von der Konzentration des Rohrzuckers abhängig. Es ist anzunehmen, daß diese Regel auch für andere Kohlenstoffquellen gilt; das Gesetz der Höchstentwicklung bei einem Konzentrationsoptimum trifft ja allgemein zu. *H. Lappalainen* fand auch für Dextrose bei mittlerer Konzentration die längste Dauer der Pilzstärkereaktion, was sie damit erklärt, daß hier „weder das Enzym oder die Enzyme noch freie Säuren“[1]) produziert werden. Ich konnte hingegen zeigen, daß gerade im Zusammenhang mit dem stärksten Wachstum die stärkste Säuremenge gebildet wird, und gerade darauf führe ich die Pilzstärkebildung bei den betreffenden Konzentrationen zurück.

[1]) *H. Lappalainen*, Biochemische Studien an Aspergillus niger, S. 14. Helsingfors 1919.

Proz.	5. V.		12. V.		19. V.		26. V. •		2. VI.	
	Habitus	Jodfärbung	Habitus	Jodfärbung	Habitus	Jodfärbung	Habitus	Jodfärbung	Habitus	Jodfärbung
10	fest, wellig, noch Lücken	mehr blau als braun	stärker geworden, reichlich Conidien	mehr blau als braun	nicht verändert	Falten grau, Buchten braun	nicht verändert	Buchten schwach blaugrau	kaum verändert	grau
15	fest, wellig, unten gelblich	mehr blau als braun	reichlich Conidien	unten blau, oben gemischt	nicht verändert	Falten grau, Buchten braun	nicht verändert	blaugrau	kaum verändert	grau
20	fest, wellig, noch Lücken	mehr blau als braun	dick, samtig, Spur Conidien	unten blau, oben gemischt	kaum verändert	nur unten schön blau	etwas mehr Conidien	gemischt	kaum verändert	schwach weinrot
25	dicht, weiß und weich	gleich blau und braun	weiß und weich	schmutzig bläulich	samtig	unten bläulich, oben braun	ganz wenig Conidien	kaum verändert	Beginn der Autolyse	schwach weinrot
30	weiß, ziemlich weich	gleich blau und braun	weiß und weich	schmutzig bläulich	weiß und samtig	unten bläulich, oben braun	ganz wenig Conidien	blaugrau	ziemlich starke Autolyse	Spur blau, sonst gelb
40	glatt, dünn und weich	mehr braun als blau	weiß und weich	mehr braun als blau	etwas samtig	unten Spur blau, oben braun	nicht verändert	—	keine Conidien, Autolyse	schwach weinrot, sonst gelb
50	glatt, dünn und weich	rein braun	weiß und weich	rein braun	ganz wenig samtig	unten Spur blau, oben braun	nicht verändert	—	keine Conidien, Autolyse	schwach weinrot, meist gelb

Versuch: Drei Reihen von Pilzkulturen wurden in Erlenmeyerkolben von 100 ccm Inhalt mit je 25 ccm Nährlösung gezogen, Mineralsalze wie sonst, Saccharosekonzentration in geometrischer Reihe gesteigert. Die erste Reihe wurde bei 20⁰, die beiden anderen bei 30⁰ gehalten, die erste nach 6 Tagen geerntet, von den beiden anderen eine auch nach 6 Tagen und eine nach 3 Tagen, weil sie zu dieser Zeit augenscheinlich schon so weit entwickelt war, wie die bei 20⁰ gezogene Reihe am sechsten Tage. Am Erntetage wurde in sämtlichen Nährlösungen die gebildete Säure durch Titrieren mit n/30 NaOH (Indikator Phenolphthalein) bestimmt; die erhaltenen Werte sind in den Kurven (Abb. 1) dargestellt. Auf der Abszisse ist der ursprüngliche Prozentgehalt an Saccharose abgetragen, auf der Ordinate die Säurenormalität der Nährlösung, ausgedrückt durch das Quantum n/30 NaOH, das zur Neutralisation von 10 ccm dieser Lösung notwendig ist. Alle drei Kurven steigen anfangs steil an bis zu einem Maximum, fallen dann ab zuerst ziemlich steil, nachher recht flach. Dieses Verhalten stimmt mit der Ausbildung des Mycels überein; bis zu 8 Proz. aufwärts ist es kräftig, spröde und faltig, von 16 Proz. ab an Masse abnehmend, weich und glatt. Auch die Zu- und Abnahme des Pilzstärkegehaltes geht parallel mit der Kurve. Wenigstens der anfangs unerklärlich steile, nachher flache Abfall kommt auch in diesen Eigenschaften klar zum Ausdruck, der Anstieg bis zum Optimum ist hier weniger steil. Der Abfall der Säurekurve in den bei 30⁰ gezogenen Reihen zwischen 1 und 2 Proz. und der erneute Anstieg zwischen 2 und 4 Proz. scheint regelmäßig aufzutreten, wenigstens zeigten ihn vier Titrationsreihen übereinstimmend, darunter auch eine, bei der mit Sporenemulsion, also so gleichmäßig wie möglich, geimpft worden war. Doch wurde diese Erscheinung nicht weiter verfolgt. In der bei 30⁰ gezogenen 6 Tage alten Kultur ist das Maximum gegen das der 3 Tage alten nach rechts verschoben. Das hängt wahrscheinlich mit der häufig bemerkten Tatsache zusammen, daß bei niedrigen Konzentrationen der ganze Entwicklungsgang schneller durchlaufen wird, und infolgedessen hier der Säuregrad schon wieder zurückgeht, während er bei höheren Konzentrationen noch steigt.

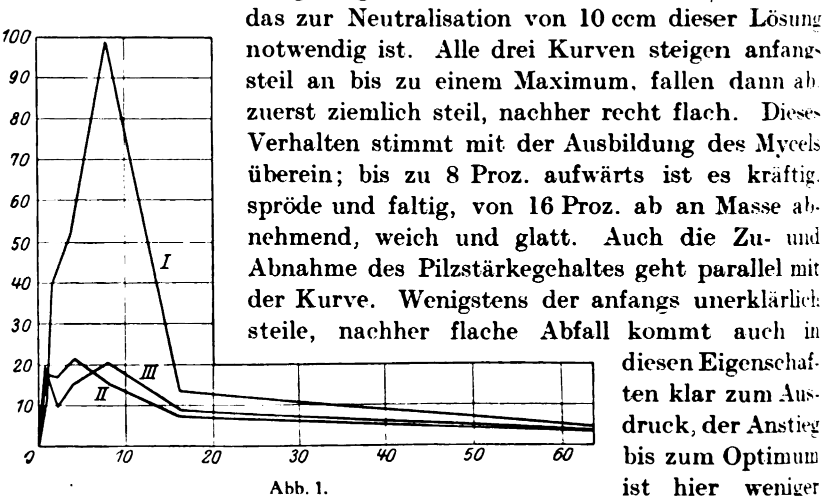


Abb. 1.
Kurve I: 6 Tage bei 20⁰ gewachsen.
Kurve II: 6 Tage bei 30⁰ gewachsen.
Kurve III: 6 Tage bei 30⁰ gewachsen.

Temperatur. Das auffallend hohe Säuremaximum in der bei 20° gezogenen Reihe paßt gut zu der Angabe von *Wehmer*[1]), nach der Aspergillus niger bei 35° weniger Oxalsäure produziert als bei 15 bis 20°. Merkwürdig ist dagegen der verschiedene Einfluß der Temperaturverschiebung auf die Säure- und die Pilzstärkebildung. Denn sowohl bei *Boas* als auch bei *Lappalainen* findet sich die Angabe, zur Bildung der Pilzstärke sei eine Temperatur von mindestens 30° erforderlich. Meinen Versuchen nach ist sie zwar bei 20° auch noch möglich, aber bei 30 bis 40° intensiver; also gerade da stärker, wo die geringere Menge Säure gebildet wird. Bei den drei Reihen der Kurve reagierten die mittleren Kulturen der beiden 30°-Reihen tiefer blau mit Jod als die mittleren Kulturen der 20°-Reihe. Auch verschiedene Diastasewirksamkeit ist kaum dafür verantwortlich zu machen, denn das Temperaturoptimum der Aspergillusdiastase liegt wie das der meisten Enzyme über 30°.

Versuch: Ein Enzymextrakt, der durch Zerreiben einiger starker Mycelien mit Sand und Wasser gewonnen war, wurde mit Stärkelösung versetzt und das Gemisch in drei gleiche Teile geteilt. Der erste wurde bei 16°, der zweite bei 30° und der dritte bei 58° gehalten. Nach 1 Stunde war die Jodreaktion im ersten noch fast rein blau, im zweiten violettrot, im dritten rot.

Es muß also ein anderer, noch unbekannter Faktor für den Einfluß der Temperatur auf die Pilzstärkebildung verantwortlich sein. Darauf komme ich noch zurück.

Schichthöhe der Nährlösung: Vorher ist noch die Bedeutung der Schichtdicke der Nährlösung zu erwähnen.

Zwei Kulturen wurden angesetzt in zwei Flaschen mit gleicher Grundfläche und senkrechter Seitenwand, die eine bekam 25 ccm, die andere 250 ccm derselben Nährlösung (Zusammensetzung wie gewöhnlich, 5 Proz. Rohrzucker). Die Oberfläche der Nährlösung ist also in beiden gleich, die Schichthöhen verhalten sich wie 1 : 10. Nach viertägigem Wachstum bei 30° haben beide dichte, starke Pilzdecken; die auf 25 ccm ist spröde, lederig, faltig, Unterseite und Nährlösung sind kräftig gelb gefärbt, die Jodreaktion ist stark blau; die auf 250 ccm ist samtig, die Nährlösung kaum sichtbar gelblich, die Jodreaktion fast rein braun. Das Zustandekommen dieses Gegensatzes ist leicht zu erklären: produziert der Pilz in beiden Kulturen dieselbe Menge potentieller Säure, so wird die $H^{\cdot}$-Konzentration, von der ja der ganze Stoffwechsel abhängt, doch in der ersten größer als in der zweiten. Handelte es sich nur um bekannte schwache Säuren, so ließe sich die Differenz nach der *Ostwald*schen Verdünnungsgleichung berechnen. Da das nicht der Fall ist, genügt es, darauf hinzuweisen, daß die Änderung des Flüssigkeitsvolumens und der Azidität einander nicht vollkommen umgekehrt proportional sind.

---

[1]) C. *Wehmer*, Botan.-Ztg. 49, 538, 1891.

Die produzierte Säuremenge scheint an sich, ohne Berücksichtigung des Dissoziationsgrades, nur abhängig von der Zuckermenge in der Volumeneinheit der Flüssigkeit und unabhängig von der Zuckermenge zu sein, die auf die Einheit der Oberfläche entfällt. Einigermaßen wird diese Vermutung durch den folgenden Versuch bestätigt. Acht Kulturen wurden in Flaschen von gleicher Grundfläche und senkrechter Seitenwand angesetzt. Mineralsalze wie gewöhnlich, bei allen in derselben Konzentration, Temperatur 20°.

Reihe 1:

Kultur	1	erhält	10 ccm	Nährlösung	mit	20,00	Proz.	Saccharose
„	2	„	20 „	„	„	10,00	„	„
„	3	„	40 „	„	„	5,00	„	„
„	4	„	80 „	„	„	2,50	„	„

Reihe 2:

Kultur	5	erhält	10 ccm	Nährlösung	mit	10,00	Proz.	Saccharose
„	6	„	20 „	„	„	5,00	„	„
„	7	„	40 „	„	„	2,50	„	„
„	8	„	80 „	„	„	1,25	„	„

Innerhalb jeder Reihe ist die Saccharosemenge pro Flächeneinheit in allen Kulturen dieselbe. Wäre die Säurebildung von dieser Größe abhängig so müßten der Pilzstärkegehalt und die anderen damit zusammenhängenden Eigenschaften von 1 bis 4 und von 5 bis 8 gleichmäßig abnehmen. Das ist aber nicht der Fall; die Jodreaktion ist in den beiden mittleren Kulturen jeder Reihe mehr blau als braun, in den übrigen mehr braun als blau. Mit Ausnahme der Stellung der Kultur 5 paßt das Ergebnis zu den angenommenen Beziehungen. Eine nähere Untersuchung der Frage liegt nicht im Rahmen dieser Arbeit.

Zusammenfassend läßt sich über die äußeren Entstehungsbedingungen der Pilzstärke sagen, daß ihre Wirkung sich zum Teil, aber nicht vollständig, auf Säure- und Diastasebildung zurückführen läßt bzw. auf die Rolle, die eine Steigerung des Verhältnisses N : C spielt durch Zurückdrängen des Kohlehydratstoffwechsels gegen den N-Stoffwechsel. Der unerklärte Rest (Temperatur) weist darauf hin, daß an der Bildung der Pilzstärke noch andere Faktoren beteiligt sind, deren Zusammenhang mit den eben besprochenen nicht ohne weiteres zu erkennen ist.

Bildung einer Vorstufe. Sie liegen im Innern der Pilzzelle. Die Pilzstärke wird nicht direkt aus den Zuckermolekülen synthetisiert, in die sie sich spalten läßt. Das ist schon aus der gleich guten Verwertbarkeit der verschiedenen Kohlenstoffquellen für Pilzstärkekulturen zu erkennen, sowie aus dem Umstand, daß sie nie in ganz jungen Mycelien auftritt. Sie entsteht vielmehr aus einer im Pilzkörper gebildeten Vorstufe, wie der folgende, mehrfach wiederholte Versuch zeigt: Ein junges Mycel, das auf der gewöhnlichen[1]) Nährlösung ge-

---

[1]) Diese enthält, wenn nicht anders angegeben, 5 Proz. Saccharose; Mineralsalze s. S. 225.

wachsen ist und erst eine dünne, noch pilzstärkefreie Decke bildet — dieser Entwicklungsgrad wird bei 20° in den meist verwendeten kleinen Kolben im allgemeinen in 2 bis 3 Tagen erreicht —, wird abgenutscht, ausgewaschen und auf eine Nährlösung übertragen, die die üblichen Mineralsalze, dazu 0,5 Proz. H_2SO_4, aber keine organische Substanz enthält. Nach 2 oder 3 Tagen wurde durch Jodzusatz auf Pilzstärke geprüft. Die Reaktion fiel regelmäßig positiv aus, manchmal sogar sehr stark, d. h. die Pilzstärke entsteht unter geeigneten Aziditätsbedingungen auch bei zeitweiligem Kohlenstoffhunger, also wahrscheinlich durch Umlagerung oder Abbau einer ebenfalls hochmolekularen Verbindung. Es ist meines Erachtens kaum anzunehmen, daß der Organismus in Hungerzeiten ein niedrig molekulares Kohlehydrat zu einem höher molekularen polymerisiert, anstatt es zu veratmen.

Chemische Natur der Vorstufe. Nun erhebt sich die Frage: Welches ist die Vorstufe der Pilzstärke? Pilzstärkefreies Mycel färbt sich braun mit Jod, was *Waterman* als Glykogenreaktion deutete. Neben dieser Jodfärbung hat er nur noch einen Nachweis dafür, nämlich die Reduktion *Fehling*scher Lösung durch den mit kochender HCl gewonnenen Pilzextrakt. Danach erscheint es mir recht zweifelhaft, ob er wirklich Glykogen gefunden hat. Denn ein von Pilzstärke befreites oder auch ursprünglich freies Mycel färbt sich immer mehr oder weniger braun mit Jod, auch nach dem Kochen mit verdünnter Säure oder Lauge, auch nach achtstündiger Extraktion mit Wasser im Soxhletapparat. Wendet man dieses Extraktionsverfahren auf pilzstärkefreies Mycel an, so geht zwar ein Polysaccharid in Lösung, das beim Kochen mit Säure reduzierenden Zucker liefert; dieses färbt sich aber nicht mit Jod oder wenigstens nur so schwach gelblich, daß es nicht der Träger der Jodreaktion im Mycel sein kann. Dagegen erhält man mit Chitin eine schöne braune Jodreaktion; Chitin ist an der Zusammensetzung der Zellmembran von Aspergillus niger beteiligt und hat durchaus die Resistenz gegen chemische Angriffe, die nach den genannten Versuchen von dem braun mit Jod reagierenden Stoff des Pilzes zu erwarten ist. Was die fragliche Umwandlung von Glykogen in Pilzstärke angeht, so läßt sich nur feststellen, daß Aspergillus zwar Glykogen abbaut, daß aber *Heinze*[1]) in seiner ausführlichen Arbeit über diesen Gegenstand nie ein mit Jod blau färbbares Zwischenprodukt bemerkte. Auch ich konnte weder mit noch ohne Säurezusatz eine solche Substanz aus Glykogen gewinnen.

Weiter war denkbar, die Pilzstärke entstände durch Desamidierung mit nachfolgender Umlagerung des Chitins. Ihre Entstehung müßte dann mit großer Wahrscheinlichkeit durch Übertragen einer jungen

[1]) *B. Heinze*, Centralbl. f. Bakt. II, **12**, 43, 177, 355, 1904.

Kultur auf stickstofffreie Nährlösung zu bewirken sein; ohne Säurezusatz gelang das aber nicht. Ausgeschlossen wird die Möglichkeit der Umwandlung des Chitins durch den Nachweis, daß der Pilz nicht imstande ist, Chitin anzugreifen.

Der Boden dreier Erlenmeyerkolben von 300 ccm Inhalt wurde mit Watte bedeckt und diese in zwei Kolben mit reinem, aus Krabbenpanzern nach der Methode von *Brach*[1]) dargestelltem Chitin bestreut. (Die Watte dient nur dazu, das Chitin an der Oberfläche zu halten.) In allen drei Kolben wurde die Watte mit 50 ccm Nährlösung von der gewöhnlichen Zusammensetzung, aber ohne Stickstoffverbindung, getränkt; alle drei wurden stark geimpft und bei 30° gehalten. In allen drei Kolben trat ein ganz schwaches Wachstum ein; nach 3 Tagen war ein außerordentlich dünnes, kaum makroskopisch sichtbares Häutchen gebildet, das auch nach 2 Wochen nicht stärker wurde. Nach einer Woche hatten alle drei Kulturen einige Konidien; Pilzstärke wurde nur nach Säurezusatz gebildet. Das Chitin blieb intakt, seine Jodreaktion änderte sich nicht, und das Wachstum darauf war ebenso gering wie in dem Kontrollkolben. Ob dieses Wachstum durch den Stickstoffgehalt der Sporen oder eine Verunreinigung einer der zugegebenen Substanzen, etwa der Watte, ermöglicht wurde, ist hier belanglos.

Die meisten Gründe sprechen wohl für die Annahme, daß das Paradextran oder die wahrscheinlich damit identische Fungose die Vorstufe ist. Dieses Polysaccharid wurde 1897 von *Tanret*[2]) als Bestandteil der Zellmembran bei Aspergillus glaucus, 1902 von *Ivanoff*[2]) bei Aspergillus niger nachgewiesen. Ich konnte ein Polysaccharid aus pilzstärkefreien Mycelien darstellen, das wahrscheinlich Paradextran ist. Die Kulturen waren 5 Tage auf einer Nährlösung gewachsen, die durch Ersatz des NH_4NO_3 durch KNO_3 von der üblichen abwich; sie färbten sich rein braun mit Jod. Sie wurden 6 Stunden im Soxhletapparat mit Wasser extrahiert, der Extrakt mit Alkohol versetzt, der dabei entstehende Niederschlag nach dem Absetzen abgenutscht, in kochendem Wasser wieder größtenteils gelöst und die Lösung unter dauerndem Filterwechsel durch einen Heißwassertrichter von dem schwärzlichen Rückstand abfiltriert. Beim Abkühlen scheidet sich aus der Lösung ein rein weißer, gallertiger Niederschlag ab. Er färbt sich fast gar nicht mit Jodjodkalium, gelb mit Chlorzinkjod, blau mit Jod und Schwefelsäure. Beim Kochen mit Säure liefert er ein Produkt, das *Fehling*sche Lösung und alkalische Jodlösung reduziert und die Farbreaktionen der Aldohexosen gibt. Eine besondere Reaktion fiel

[1]) *Brach*, diese Zeitschr. 38, 468.
[2]) Siehe *J. Zellner*, Chemie der höheren Pilze. Leipzig 1907.

mir an dem Präparat auf, die es mit der Pilzstärke teilt; beim Eindampfen der Lösung bildet sich an der Oberfläche der Flüssigkeit ein Häutchen, wie es *Tanret*[1]) bei Amylose beschrieben hat. Das Paradextranhäutchen färbt sich nicht mit Jod und gibt nach dem Kochen mit Säure die oben genannten Zuckerreaktionen. Vielleicht liegt die Gemeinsamkeit dieser Reaktion an einer chemischen Verwandtschaft zwischen Paradextran und Pilzstärke[2]). Einen sicheren Schluß lassen diese Reaktionen allerdings noch nicht zu.

Umwandlung der Vorstufe durch ein Enzym. Die nächste Frage war: Geht die Umwandlung der Vorstufe in die Pilzstärke unter Beteiligung eines Enzyms vor sich oder lediglich unter dem Einfluß der freien Säure? *Boas* hatte früher die Alternative gestellt: Wird die Pilzstärke aus Zucker durch Säure i. st. n. synthetisiert oder durch ein Enzym? Er kam damals zur Annahme der zweiten Möglichkeit auf Grund der Beobachtung, daß Säurezusatz vor der Impfung auf Nährlösungen die Bildung von Pilzstärke bewirkt, wo sonst keine entsteht. Später nahm er diesen Schluß zurück und sagte statt dessen, daß sie Membranstoffen entstamme, wie schon *H. Lappalainen* fand. Meiner Meinung nach schließt die Herkunft der Pilzstärke aus Membranstoffen die Beteiligung eines Enzyms bei ihrer Entstehung nicht aus. Daß tatsächlich eine solche notwendig ist, geht aus folgendem Versuch hervor: Vier junge, pilzstärkefreie Mycelien — 3 Tage bei 20^0 auf einer Nährlösung gewachsen, die neben den üblichen Mineralsalzen nur 1 Proz. Saccharose enthielt — wurden durch 10 Minuten langes Kochen abgetötet. Von jedem wurde eine Hälfte auf frische gewöhnliche Nährlösung übertragen, die andere Hälfte auf Nährlösung mit 0,5, 1,5, 5 bzw. 25 Proz. H_2SO_4-Zusatz. Nach dreitägigem Stehen bei 30^0 gab keiner der Teile eine bemerkenswerte Pilzstärkereaktion.

Lähmung der Pilzdiastase. Es ist allerdings nicht leicht anzunehmen, daß das betreffende Enzym nur unter den für die Pilzstärkebildung günstigen Umständen produziert wird. Diese Schwierigkeit wird durch die Anschauung von *Boas* behoben, nach der die Pilzstärkebildung durch Säurelähmung der Pilzdiastase zustande kommt. Die Säurebildung wäre demnach ein vom Pilze selbst geübtes Abfangverfahren.

[1]) *Tanret*, Chem. Centralbl. **1915**, II, 73; Bull. Soc. Chim. de France (4) **17**, 83.

[2]) Ein Paradextranpräparat, das ich mit einem wässerigen Auszug aus mit Sand zerriebenem Aspergillus niger-Mycel einen Tag stehen ließ, färbte sich nach dieser Behandlung schwach blau mit Jod; verdünnte H_2SO_4 ruft diesen Effekt in derselben Zeit hervor, 0,2proz. NaOH in 14 Tagen. Durch Züchten des Pilzes auf Paradextran als einziger Kohlenstoffquelle konnte ich eine solche Wirkung aber nicht ohne Säurezusatz erzielen.

Mir schien eine Nachprüfung dieser Verhältnisse notwendig zu sein, weil der Abbau der Pilzstärke oft vor dem Rückgang der Azidität einsetzt, und weil auch in solchen Kulturen Pilzstärke gebildet wird, die von Stärke als einziger Kohlenstoffquelle leben, also nach Versuchen von *Euler*[1]) besonders viel Diastase enthalten. Diese Erscheinung läßt sich allerdings auch dadurch erklären, daß die Säurelähmung der Diastase erst eingetreten ist, nachdem genug Stärke für den Aufbau des Organismus gespalten war; nach den folgenden Versuchen ist diese Deutung allein möglich.

Einige Pilzdecken, die 4 Tage bei 30° auf einem Nährboden gewachsen waren, der die üblichen Mineralsalze und 5 Proz. Kartoffelstärke als einzige Kohlenstoffquelle enthielt, und sich mit Jodlösung schön blau färbten, wurden mit Sand zerrieben. Die entstandene Masse wurde zur Enzymgewinnung nicht wie sonst mit Wasser extrahiert, sondern mit der Nährlösung einer pilzstärkereichen Kultur, die ja die Azidität hat, bei der die Diastase unwirksam sein soll. (Die Nährlösung hatte ursprünglich die gewöhnliche Zusammensetzung — 5 Proz. Rohrzucker —, der Pilz war 4 Tage darauf gewachsen.) Zu einer Reihe von Proben des so gewonnenen Extraktes wurden steigende Mengen einer 2proz. Lösung löslicher Stärke in Wasser, zu einer zweiten Reihe entsprechende Mengen einer gleich starken Lösung in der genannten Nährflüssigkeit zugesetzt. Die Jodreaktion war in der zweiten Reihe noch nach $1\frac{1}{2}$tägigem Stehen bei 30° (unter Toluol) fast dieselbe wie im Anfang des Versuchs; d. h. die Diastase ist praktisch unwirksam. In der ersten Reihe war die Stärke infolge der Verdünnung der Säure, allerdings nur unvollständig, abgebaut worden.

Bedeutung der Pilzstärke für den Organismus. Damit stimmt die Beobachtung überein, daß bei Übertragung mit Jod blau reagierender Mycelien auf kohlenstofffreie Nährlösung die Pilzstärke nur dann einigermaßen abgebaut wird, wenn man keine Säure zusetzt.

Versuch: Die Pilzdecken einer Zuckervariationsreihe wurden im Alter von 2 Tagen nach gründlichem Auswaschen auf eine Lösung

Saccharosegehalt der ersten Nährlösung	2 Proz.	3 Proz.	4 Proz.	5 Proz.	10 Proz.	20 Proz.
Jodreaktion bei Übertragung auf die C-freie Nährlösung	braun, Spur blau	blau			grau, Spur blau	braun, Spur blau
Jodreaktion nach 2 Tagen Hunger	braun, Spur blau	das alte Mycel ziemlich blau, das neue braun			braun, Spur blau	
Jodreaktion nach 4 Tagen Hunger	bräunlich, winzige Stellen blau			hellbraun		

[1]) *H. v. Euler*, Chemie der Enzyme 1, 296. München und Wiesbaden 1920.

der gewöhnlich gegebenen Mineralsalze ohne organische Substanz übertragen. Alle bildeten neue Hyphen und viele Konidien. Am vierten Tage hatte bei allen, besonders bei 3, 4 und 5 Proz. Autolyse eingesetzt.

Wiederholt man diesen Versuch mit einem Zusatz von 0,3 Proz. H_2SO_4 zu der kohlenstofffreien Nährlösung, so erhält man 3 Tage nach der Übertragung in allen Kulturen stärker blaue Jodreaktion als vorher und keine Konidienbildung. Läßt man die Mycelien auf ihrer ersten Nährlösung, so wird die Pilzstärke auch meistens dann abgebaut, wenn sich Konidien bilden. Sie dient also als Reservestoff, aber wohl wie das Paradextran nicht ausschließlich, sondern auch zur Festigung der Zellwand. Es läßt sich nicht sagen, ob sie ein normalerweise auftretendes Zwischenprodukt des Pilzstoffwechsels darstellt, das durch die Säure festgehalten und angehäuft wird, oder ob normalerweise an ihrer Stelle etwas anderes entsteht, vielleicht die Trehalose, die von *Bourquelot* bei Aspergillus nachgewiesen ist. Auch in der Trehala-Manna kommt ja die Trehalose neben dem Trehalum[1]) vor, einem Polysaccharid, das sich mit Jod blau färbt. Natürlich stehen solche Vermutungen auf unsicherem Boden, solange die chemische Konstitution der betreffenden Stoffe noch nicht aufgeklärt ist.

III. Chemie der Pilzstärke.

Darstellung. Die Untersuchung der chemischen Konstitution der Pilzstärke bildet den Inhalt des nächsten Teiles dieser Arbeit.

Das Untersuchungsmaterial wurde auf folgendem Wege gewonnen: Der Pilz wurde in Petrischalen von 28 cm Durchmesser und 7 cm Höhe gezogen. Jede dieser Schalen bekam 1 Liter der schon öfter genannten Nährlösung. Nährlösung und Schalen wurden getrennt sterilisiert, die Schalen meist nicht durch Hitze, sondern durch Ausspülen zuerst mit einer Lösung von $K_2Cr_2O_7$ in konzentrierter H_2SO_4, dann mit 50proz. Alkohol. Drei solcher Schalen wurden in einem auf 30° gehaltenem Thermostaten, nur durch eine Schicht Wellpappe voneinander getrennt, übereinander aufgestellt. Durchschnittlich alle 5 Tage waren kräftige, faltige, pilzstärkereiche Mycelien emtereif. Der Pilzstärkegehalt der Nährlösung war nie beträchtlich groß, auch ist die Darstellung der Substanz aus der Nährlösung schwierig; Alkohol fällt daraus nach anfänglicher weißer Trübung einen braunen Syrup, der noch andere Stoffwechselprodukte des Pilzes enthält. Daher beschränkte ich mich auf die Gewinnung der Pilzstärke aus dem Mycel. Die Pilzdecken wurden ausgewaschen und in einem Soxhletapparat 8 bis 10 Stunden mit Wasser extrahiert. Dabei scheint die Pilzstärke unverändert zu bleiben, während ein Extrakt, der bei 130° und 2 Atmosphären Druck im Autoklaven gewonnen wurde, sich mit Jod violett färbte; hier lag also schon ein Abbau vor. Zu dem Extrakt, der

---

[1]) *Scheibler* und *Mittelmeier*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **26**, 1331, 1893.

meistens alle nachweisbare Pilzstärke des Mycels aufgenommen hatte, wurde Alkohol zugefügt, bis die Flüssigkeit 58 bis 60 Proz. Alkohol enthielt. Der Niederschlag setzte sich über Nacht ab. Er wurde dann abgenutscht, für quantitative Bestimmungen in einen gewogenen Goochtiegel, sonst auf ein großes gehärtetes Filter. Die Ausbeute aus einer Pilzernte betrug 0,5 bis 1 g; da aber — nach *Lappalainen* — verschiedene Stämme verschieden starke Neigung zur Pilzstärkebildung haben, so läßt sich aus anderen Stämmen vielleicht eine bessere Ausbeute erzielen. Dem Pilzstärkegehalt der Nährlösung nach bilden *H. Lappalainens* Stämme jedenfalls größere Mengen der Substanz als der von mir verwendete.

Die so erhaltene Pilzstärke ist noch stark verunreinigt. Die Berlinerblauprobe zeigt noch Stickstoffgehalt an. Welches die beigemengten Substanzen sind, ließ sich nicht feststellen. Im Extrakt ist eine ganze Reihe solcher Stoffe nachzuweisen: ein gelb gefärbter Stoff, der sich in organischen Lösungsmitteln nicht löst; ein anderer, der in die Alkoholfällung mitgeht, der sich beim Ausschütteln in Äther löst, wobei sich die Lösung nur langsam unter Entwicklung von Gasperlen in fast fester, gallertiger Form über dem Wasser sammelt. Nach dem Verdunsten des Äthers erhält man einen amorphen, weißen, nach Gummi riechenden Niederschlag. Auch organische Säuren werden natürlich im Ätherextrakt sein. Kocht man das Mycel vor der Wasserextraktion einige Stunden mit Äther aus, so ist es nachher nicht mehr spezifisch leichter als Wasser; vielleicht einfach deshalb, weil dann die Luft zwischen den Hyphen besser durch Wasser verdrängt werden kann. Der Äther löst dabei eine offenbar ungesättigte Verbindung — vielleicht ein Ergosterin —, die sich vorher bemerkbar macht, indem sie die bei Jodzusatz eintretende Blaufärbung der Pilzstärke allmählich zum Verschwinden bringt. Setzt man dann von neuem die gleiche Jodmenge zu, so geht die Entfärbung langsamer, bei jeder nächsten Wiederholung noch langsamer, bis sie ganz ausbleibt und ein blauvioletter Niederschlag ausfällt. Die Erscheinung der wiederholten Entfärbung kann man bei Fettzusatz zu einer Stärkelösung künstlich hervorrufen. Manchmal tritt allerdings auch nach vorausgegangener Ätherextraktion des Mycels eine plötzliche Entfärbung der Jodpilzstärke ein, deren Ursache ich nicht weiter nachgegangen bin. Der Extraktionsäther setzt bei längerem Stehen einen schleimigen, nach Bouillon riechenden Niederschlag ab. Unterbleibt die Ätherauskochung, so geht der Geruchsstoff in den wässerigen Extrakt, wird aber nicht durch Alkohol gefällt. Nach dem Abdestillieren des Alkohols setzt er sich auch hier allmählich als farbloser Niederschlag ab, die überstehende Flüssigkeit scheint bei Zusatz starker Säuren neue ähnliche Geruchsstoffe zu bilden. Ein anderer Körper läßt sich mit Wasserdampf in geringer Menge überdestillieren und erstarrt im Kühler. Die meisten dieser Stoffe gehen nicht mit in die Alkoholfällung hinein. Auch ist keine mit *Fehling*scher Lösung fällbare Substanz darin enthalten, wie sie *Karrer*[1]) bei der Darstellung des Isolichenins als Nebenprodukt fand. Trotzdem erhält man die Pilzstärke bedeutend reiner durch Wiederauflösen und Wiederfällen, wie die quantitative Zuckerbestimmung nach der Säurespaltung zeigt, und auch schon ihr Aussehen: solange er wasser- oder alkoholhaltig ist, sieht zwar auch der einmal gefällte Niederschlag rein weiß aus, nach dem Trocknen aber erscheint er schmutzig braun; der zweimal oder dreimal gefällte dagegen bildet beim Trocknen farblose.

---

[1]) *Karrer* und *Joos*, H.-S. Zeitschr. f. physiol. Chem. **135**, 311, 1924.

durchscheinende Blättchen. Der Materialersparnis wegen begnügte ich mich meist mit zweimaliger Fällung.

Häutchenbildung und Retrogradation. Dampft man Pilzstärkelösung ein, so bildet sich neben etwas braunem Sirup, wie schon erwähnt, auf der Oberfläche der Flüssigkeit ein Häutchen, das sich mit Jodlösung blauviolett färbt und nach dem Kochen mit Säure Zuckerreaktionen gibt. Dieselbe Reaktion ist von der Stärke bekannt; nach *Tanret*[1]) wird sie durch die Inhaltssubstanz des Stärkekorns, die Amylose, verursacht, indem sich diese in der Hitze kondensiert.

Eine langsame Kondensation der Amylose bei längerem Stehen in der Kälte führt nach *Maquenne*[2]) zu der Retrogradation, einer Abscheidung der in eine unlösliche Form übergegangenen Substanz. Dieselbe Erscheinung ist auch bei Pilzstärkelösung zu beobachten. Diese Koagulation wird durch Zusatz von $FeCl_3$ oder $Al_2(SO_4)_3$, viel weniger durch H_3PO_4 beschleunigt; sie scheint demnach mit der elektrisch negativen Kolloidnatur der Substanz zusammenzuhängen, wenn sie auch weit langsamer vor sich geht als sonst Kolloidfällungen durch Elektrolyte. (Die kolloidale Natur der Pilzstärke zeigt sich darin, daß sie nicht durch Kollodiummembran dialysierbar ist.) Aus dem Pilzextrakt scheint noch eine andere Substanz mit auszufallen; steht er einen Tag, so scheidet sich ein bräunlicher Niederschlag ab; er färbt sich violett, die darüber stehende Flüssigkeit fast nicht mehr mit Jod. Bei längerem Stehen trennt sich der Niederschlag in zwei Schichten, eine obere weiße und eine untere braune; der Träger der Jodreaktion ist die weiße. Steht sie 8 bis 10 Tage, so bekommt man keine Jodfärbung mehr.

Salzhydrolyse. Noch regelmäßiger als das Absetzen des Niederschlages ist im Extrakt die Änderung der Jodreaktion. Färbt sich der Extrakt auch in frischem Zustande rein blau mit Jod, so gibt er doch nach einigen Stunden nur noch ein Violett und am nächsten Morgen nur noch Rot, und auch dies verschwindet bei genügend langer Versuchsdauer wohl immer. Es handelt sich offenbar um dieselbe Erscheinung, die *Biedermann*[3]) an Stärke und Amylose untersucht und als Salzhydrolyse gedeutet hat. Die Übereinstimmung beider Vorgänge ist beachtenswert; die Abbaustufen der Pilzstärke geben dieselben Farben mit Jod wie die der Stärke oder der reinen Amylose.

Säurehydrolyse. Dasselbe ergibt sich beim Kochen mit Säure.

---

[1]) l. c.

[2]) Siehe unter anderen *Pringsheim*, Die Polysaccharide, 2. Aufl., S. 119. Berlin 1923.

[3]) *W. Biedermann*, diese Zeitschr. **135**, 282, 1923; Zeitschr. f. angew. Chem. **37**, 71.

Versuch: 0,18 g einmal gefällte Pilzstärke, in 50 ccm Wasser gelöst, wurde mit 1 Proz. H_2SO_4 2 Stunden gekocht; 0,5 ccm der Lösung färben sich mit einem Tropfen n/100 Jodlösung:

vor der Hydrolyse	rein blau,
nach ½stündiger Hydrolyse . . .	violett,
„ 1 „ „ . . .	weinrot,
„ 1½ „ „ . . .	gelblich rosa,
„ 2 „ „ . . .	gelbbraun.

Ein Stärkekleister von entsprechender Konzentration gibt unter diesen Bedingungen dieselben Abbaustufen, doch wird die Leiter im ersten Teile langsamer, im zweiten Teile etwas schneller durchlaufen als bei Pilzstärke. Reine Amylose dagegen, die durch Erwärmen von 2 g Kartoffelstärke mit 100 ccm Wasser bis auf 58° und Abfiltrieren der entstandenen Lösung gewonnen war [nach *Ling* und *Nanji*[1])], durchläuft sie mit derselben Geschwindigkeit wie Pilzstärke.

Das Endprodukt der Säurespaltung scheint auch bei Pilzstärke ausschließlich Glucose zu sein. Sie wurde für den Zweck der Zuckerbestimmung 3 Stunden mit 2 Proz. H_2SO_4 am Rückflußkühler gekocht, mit $Ba(OH)_2$ unter Zusatz eines Tropfens Phenolphthalein neutralisiert, vom $BaSO_4$ abfiltriert und, wenn nötig, etwas eingedampft. Die so erhaltene Zuckerlösung ist der alkoholischen und der Buttersäuregärung fähig: ein Teil wurde mit einem der vorhandenen Zuckermenge schätzungsweise gleichen Gewicht Preßhefe geschüttelt und in ein *Einhorn*sches Gärröhrchen gefüllt und bei 30° gehalten; schon nach 1½ Stunden hatte in diesem kräftige, in einem Kontrollröhrchen (Hefe + Wasser) keine Gasentwicklung stattgefunden. Ein anderer Teil wurde mit 1,5 Proz. Agar-Agar und den erforderlichen Mineralsalzen sterilisiert und mit Bac. amylobacter geimpft; 2 Tage darauf starke Gasentwicklung und Buttersäuregeruch. Vor allem der Hefeversuch beweist die Anwesenheit von Hexosen.

Auf die Abwesenheit von Pentosen läßt sich aus dem Verlauf der Furfurolreaktion schließen; die beim Erwärmen von Pilzstärke mit H_2SO_4 entstehenden Dämpfe röten Anilinacetatpapier nur schwach, nicht stärker als die aus reiner Glucose.

Molischs Reaktion tritt mit der Zuckerlösung erst nach einer Minute ein, die Resorcinreaktion erst beim Erwärmen; beim Unterschichten mit konzentrierter H_2SO_4 entsteht kein brauner Ring; demnach sind keine Ketosen, nur Aldosen vorhanden[2]).

Mit Phenylhydrazin und Essigsäure gibt die Zuckerlösung in der Kälte und bei gelindem Erwärmen keinen Niederschlag, wodurch die

---

[1]) *Ling* und *Nanji*, Journ. Chem. Soc. of London **123**, 2666.

[2]) *B. Tollens*, Kurzes Handbuch der Kohlenhydrate, 3. Aufl. Leipzig 1914.

Gegenwart von Mannose ausgeschlossen wird. Nach einstündigem Kochen entsteht ein gelber Niederschlag, der Glucosazon enthält und nach dem Umkristallisieren aus pyridinhaltigem Wasser und Alkohol annähernd den richtigen Schmelzpunkt zeigt, nämlich 204⁰.

Für quantitative Bestimmungen des Zuckers wurde die zweimal gefällte Pilzstärke in einen gewogenen Goochtiegel filtriert und bei 100⁰ bis zur annähernden Gewichtskonstanz getrocknet. (Ich mußte mich mit dem annähernden Wert begnügen, da die Substanz bei der Trockentemperatur leicht an der Oberfläche unter Bräunung und Röstgeruch etwas zersetzt wird; auch ist sie hygroskopisch.) Der Goochtiegel wurde dann in ein Becherglas gebracht, die Pilzstärke gelöst und, ohne vom Asbest abzufiltrieren, hydrolysiert und neutralisiert. Die Analyse wurde nach der Hypojoditmethode von *Willstätter* und *Schudel* in der von *Auerbach* und *Bodländer*[1]) modifizierten Form ausgeführt, und zwar mit n/100 Jod- und Thiosulfatlösung. Der Berechnung wurde die Annahme zugrunde gelegt, der reduzierende Zucker sei ausschließlich Glucose. Als günstigste Ausbeute wurden gefunden: 0,271 g Glucose aus 0,267 g Pilzstärke. Der theoretische Wert wäre für eine reine, nur aus anhydridartig verknüpften Glucosemolekülen aufgebaute Verbindung 0,297 g Glucose. Die Ausbeute beträgt also 91,2 Proz. der Theorie. In verschiedenen anderen Analysen ergaben sich etwas niedrigere Werte, aber nicht weniger als 80 Proz. der Theorie.

Dagegen bei der Bestimmung auf optischem Wege — wieder unter der Voraussetzung, es handelte sich ausschließlich um Glucose — fand ich einmal 0,325 g Glucose aus 0,358 g Pilzstärke, d. h. 81,7 Proz. der Theorie; sonst noch niedrigere Werte. Das Zurückbleiben der Drehung hinter der Reduktion liegt wahrscheinlich an optisch aktiven Verunreinigungen; *Boas* erhielt ja auch bei der Bestimmung der spezifischen Drehung der unzersetzten Pilzstärke Werte, die zwischen + 120 und + 160⁰ für $[\alpha]_D$ schwankten. Trotzdem kann meine Voraussetzung als genügend bestätigt gelten, denn die spezifische Drehung der sonstigen natürlich vorkommenden Hexosen weicht so weit von der der Glucose ab, daß eine Beimengung einer von ihnen in auch nur einigermaßen beträchtlichen Mengen ausgeschlossen erscheint.

Vergärung durch Bacillus macerans. Die nächste Frage war die nach dem Verhalten der Pilzstärke gegenüber Enzymen.

Hier sei zuerst die Vergärung durch Bacillus macerans *Schardinger* erwähnt. Vier Röhrchen mit 3 ccm annähernd 2proz. Pilzstärkelösung, der die von *Schardinger* angegebenen Nährsalze[2]) zugesetzt waren,

[1]) *Auerbach* und *Bodländer*, Zeitschr. f. angew. Chem. **36**, Nr. 77.
[2]) *F. Schardinger*, Zentralbl. f. Bakt. II, **22**, 98.

wurden mit dem Bacillus[1]) geimpft und bei 25° gehalten. Obwohl während der drei Sterilisiertage schon Retrogradation eingetreten war, war doch nach 1½ Tagen im ersten und nach 2½ Tagen in zwei weiteren Röhrchen die Gärung lebhaft im Gange. Die Vergärung der Pilzstärke durch Bacillus macerans ist eine weitere Analogie zu dem Verhalten der Stärkebestandteile.

Spaltung durch Amylasen und Emulsin. Auch durch Diastase wird Pilzstärke abgebaut; das Endprodukt ist auch hier Maltose. Nachweis: Eine Lösung von 0,1 g Pilzstärke in 10 ccm Wasser wurde mit gefällter Malzdiastase, die sich in einer Kontrollprobe als maltosefrei erwies, 2 Stunden bei 50° gehalten. Dann wurde sie 10 Minuten mit 10 Proz. NH_4OH gekocht und färbte sich dabei schön krapprot. Diese Reaktion geben nach *Wöhlk*[2]) nur Maltose und Lactose, sie kann also hier nur von Maltose herrühren.

Um so auffallender sind die mit Jod färbbaren Zwischenprodukte beim Abbau der Pilzstärke mit Malzdiastase. Die Achroodextrinstufe wird merkwürdig schnell erreicht, und vorher treten keine Dextrine auf, die sich mit Jod violett, rot oder bräunlich färben, sondern es gibt nur eine Leiter von verschiedenen blauen Tönen. Eine Pilzstärkelösung, die bei Jodzusatz dunkelblau wird, gibt nach kurzer Einwirkung eines Malzauszuges oder von mit Alkohol aus einem solchen Auszug gefällter Amylase hellblaue Jodreaktion, nach doppelt so langer Einwirkung etwas heller blau, und so fort; schließlich ist keine Farbreaktion mehr zu erkennen. Genau so geht es mit Pankreasamylase, sowohl mit einem Extrakt aus einem frischen Schweinepankreas als auch mit Pankreatin (von *E. Merck*). Der Pilz selbst baut dagegen die Substanz über Zwischenstufen ab, die sich mit Jod violett bzw. rot färben; in der Nährlösung älterer Kulturen sind solche oft zu beobachten. Das haben auch schon *Boas* und *Lappalainen* angegeben. Die von Bacillus macerans vergorenen Pilzstärkelösungen färbten sich ebenfalls braunrot mit Jod.

Der auffallende Gegensatz der Zwischenprodukte beim Abbau von Kartoffelstärke und Pilzstärke durch Malz- und Pankreasdiastase, der doch bei beiden zum gleichen Endprodukt führt, veranlaßte mich, in Anbetracht der bisher in allen Reaktionen gefundenen Übereinstimmung zwischen Pilzstärke und Amylose, den Abbau der beiden Bestandteile der Kartoffelstärke in Hinsicht auf diese Zwischenprodukte gesondert zu verfolgen. Bisher ist merkwürdigerweise ihr Verhalten in dieser Beziehung nur für das in der Stärke vorliegende

---

[1]) Bezogen aus der vorm. Králschen mikrobiol. Sammlung von *E. Přibram*, Wien.

[2]) Nach Biochem. Arbeitsmethoden 2. Berlin und Wien 1910.

Gemisch der beiden Substanzen beschrieben worden. Amylose und Amylopektin wurden nach der Ausfriermethode von *Ling* und *Nanji*[1]) rein dargestellt. Das Amylosepräparat verhielt sich beim Abbau mit Malz- und Pankreasdiastase genau so wie Pilzstärke. Mit Bakteriendiastase liefert sie auch ein Erythrodextrin, wie ich gelegentlich einer Kultivierung von Bacillus amylobacter auf Amyloselösung feststellte[2]). (Ein Parallelismus zwischen der Art der Einwirkung durch Bacillus amylobacter und Bacillus macerans ist wohl wenigstens für die ersten Stadien anzunehmen, zumal nach *Villiers*[3]) auch Bacillus amylobacter zu 0,3 Proz. der angewandten Stärke ein kristallisiertes Produkt liefert, das allerdings von chemischer Seite weniger Beachtung gefunden hat.)

Auf das Verhalten des Amylopektins gegen Malz- und Pankreasdiastase sowie auf die Bedeutung der merkwürdigen Reaktion der Amylose mit diesen beiden Enzymen werde ich später eingehen. Hier kommt es nur auf die Übereinstimmung der Amylose mit der Pilzstärke an.

Auch mit Emulsin, das nach *R. Kuhn*[4]) Stärke langsam abbaut, reagieren beide in derselben Weise und mit derselben Geschwindigkeit. Ein Emulsinpräparat wurde nach der Methode von *Hérissey* und *Bourquelot*[5]) aus süßen Mandeln dargestellt. Eine Pilzstärke- und eine Amyloselösung, die gleich intensive Jodfärbung gaben, wurden zu gleichen Teilen in je vier Reagenzröhrchen verteilt; je zwei der Röhrchen bekamen einen Zusatz von Emulsin in fester Form, alle acht bekamen eine Toluoldecke und wurden bei 30° gehalten. Nach 40 Stunden wurde aus jedem Röhrchen eine Probe von 1,5 ccm entnommen und mit 0,5 ccm n/1000 Jodlösung versetzt. Alle vier emulsinfreien Proben färbten sich gleich dunkelblau, alle vier emulsinhaltigen gleichmäßig ganz hellblau mit einem schwachen Stich ins Rötliche. Die Reaktion mit Emulsin verläuft demnach über dieselben Zwischenstufen wie die mit Malz- und Pankreasdiastase.

Das Ptyalin nimmt eine Sonderstellung ein. Die Stufen beim Abbau mit diesem Enzym zeigen bei Prüfung mit sehr schwachem Jodzusatz dasselbe Verhalten — abnehmende Blaufärbung — wie

---

[1]) l. c.

[2]) Bei Kulturen von Bac. amylobacter auf Amylopektin wurde ebenfalls ein Erythrodextrin gebildet, hier geht aber der Abbau viel langsamer vonstatten als bei Amylose; dadurch erklärt es sich, daß der Bacillus zwar auf Stärkekleister gut wächst, in Kartoffelkulturen aber die Stärkekörner nicht korrodiert, da das Amylopektin deren Hüllsubstanz bildet.

[3]) *Villiers*, Bull. Soc. chim. de France (3) **5**, 470, 1890.

[4]) *R. Kuhn*, H.-S. Zeitschr. f. physiol. Chem. **135**, 12, 1924.

[5]) Nach *H. v. Euler*, Chemie der Enzyme **2**. München und Wiesbaden 1922.

die Stufen beim Abbau mit Malzdiastase; bei Verwendung stärkerer Jodkonzentrationen dagegen kann man dieselbe Skala — blau, violett, rot, bräunlich — erhalten, wie beim Abbau mit kochender Säure. Der Abbau von Amylose aus Kartoffelstärke und von Pilzstärke verläuft auch hier gleichsinnig.

Nachdem nun bei so vielen Reaktionen das gleiche Verhalten von Pilzstärke und Amylose nachgewiesen wurde (auch auf die übereinstimmenden Löslichkeitsverhältnisse sei noch hingewiesen), darf man wohl behaupten, daß die beiden Substanzen identisch sind, wenn auch auf die Darstellung von Amylobiose, Dihexosan, Lävoglucosan, der Acetyl- und Methylderivate usw. angesichts der Verunreinigungen und der geringen zur Verfügung stehenden Menge des Präparats verzichtet werden mußte.

Diastatische Spaltung von Isolichenin und Iogen. Die neue Amylosereaktion wurde auch an der Flechtenstärke, dem Isolichenin, nachgeprüft, dessen Identität mit der Amylose *H. Pringsheim*[1]) kürzlich feststellte. Es ergab sich ein neuer Beweis für diese Feststellung: Durch kurzes Auskochen von getrocknetem Isländischen Moos im Soxhletapparat wurde ein Extrakt gewonnen, der beim Eindampfen übrigens auch ein jodpositives Häutchen bildete. Bei Behandlung mit Malzauszug gab er nur blaue Jodreaktion in abnehmender Intensität, aber keine violetten oder roten Töne; das war trotz seiner gelbbraunen Eigenfarbe deutlich zu erkennen. Beim Kochen mit Säure dagegen trat wie bei der Amylose eine Erythrodextrinstufe auf.

Das Isolichenin scheint kein direktes Produkt einer Photosynthese der Flechtenalgen zu sein; nach *Ziegenspeck*[2]) kommt es außer bei Cetraria islandica, wo es auch im Thallus enthalten ist, nur im Hymenium vor und verschwindet bei der Reife der Asken. Vielleicht kann man auch hierin eine Verwandtschaft mit der Pilzstärke erblicken. Wenn *Karrer-Joos* (zitiert S. 240) die *Pringsheim*sche Feststellung der Identität des Isolichenins mit der Amylose nicht völlig bestätigen konnten, sondern zum Teil ein Polysaccharid fanden, das Mannose und Galaktose ergab, so könnte das einmal am Material liegen; sodann kann jedoch ihre Fraktion B, die nur Dextrose ergab, Amylose darstellen. Ich fand, wie erwähnt, keine Mannose und keine mit *Fehling* sich niederschlagende Fraktion A bei meinem Aspergillus.

Auch mit einem Bakterienpolysaccharid wurde die Reaktion ausgeführt, dem „Iogen“ des Bac. amylobacter *A. M.* et *Bredemann*. Eine zerkleinerte Kartoffel wurde ausgekocht, der abgenutschte Extrakt mit 1,5 Proz. Agar-Agar sterilisiert und in Petrischalen gegossen. Diese wurden

---

[1]) Ber. d. deutsch. chem. Ges. 57, 1581, 1924.
[2]) *Ziegenspeck*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. 1924, H. 4, S. 116

mit Bac. amylobacter beimpft und bei 25° in einem Vakuumexsikkator gehalten, der unmittelbar vor dem Evakuieren mit 100 ccm 10proz. KOH und 10 g Pyrogallol beschickt wurde. 2 Tage nach der Impfung hatten sich runde, stark iogenhaltige Kolonien entwickelt, die sich mit Jodlösung blau bis violett färbten. Zwei solcher Petrischalen wurden mit einem Malzauszug (5 g Malz 15 Minuten mit 100 ccm Wasser extrahiert) und etwas Toluol übergossen. Nach 24 Stunden färbten sich die Kolonien zwar noch bläulich mit Jod, aber schwächer als tags zuvor; der Abbau ist hier verzögert, wahrscheinlich weil die Zellwand für die Malzdiastase nur wenig permeabel ist. Eine Rotfärbung mit Jod war nicht zu beobachten. Möglicherweise ist das Iogen des Bac. amylobacter ebenfalls Amylose, ebenso die Polysaccharide der anderen in der Einleitung genannten Bakterien. Die „Stärke", die *Grey*[1]) bei Bacterium coli untersucht hat, kann nach den von ihm angegebenen Reaktionen — Blaufärbung mit Jod, Aufspaltung in Glucose, stark schwankende Werte für $[\alpha]_D$ — wohl hierher gehören.

IV. Diastatische Spaltung der Amylose.

Nun erhob sich die Frage nach dem Zustandekommen der Spaltung der Amylose durch Enzyme vom Typus der Malzdiastase. Es wurde schon darauf hingewiesen, daß die Diastasen verschiedener Herkunft sich nicht gleich verhalten; über eine eventuelle Begründung dieser Tatsache durch Unterschiede in ihrer Konstitution läßt sich selbstverständlich zurzeit noch nichts aussagen: darum sei hier nicht näher darauf eingegangen. Ausführlicher untersucht wurden auch nur Malz- und Pankreasdiastase. Bei diesen beiden verläuft der Abbau so, daß die aufeinander folgenden Dextrinstufen bei Zusatz der gleichen Menge Jodlösung immer hellere Nuancen der blauen Farbe geben, die man mit der ursprünglichen Amyloselösung erhält; man kann die blassesten Töne ebensogut durch Verdünnen dieser ursprünglichen Lösung erzielen. Die mittleren haben allerdings einen ganz schwachen Stich ins Rötliche, die Abweichung ist aber so gering, daß man doch die Verdünnung gut zur kolorimetrischen Messung des Reaktionsverlaufs benutzen kann. Diese wurde folgendermaßen durchgeführt: Eine Reihe von Reagenzgläsern mit flachem Boden und untereinander gleichem Durchmesser bekamen je 0,5 ccm n/1000 Jodlösung. In gleichen Zwischenräumen, die an einer Sekundenuhr abgelesen wurden, wurden je 5 ccm aus einer mit Malzauszug versetzten Amyloselösung in eines dieser Gläser gefüllt. In das Vergleichsröhrchen kamen 5 ccm der diastasefreien Ausgangslösung; davon wurde der Teil dieses Volumens wieder herausgenommen und durch Wasser ersetzt, der dem Zusatz an Malzauszug zu dem anderen Teile der Lösung entsprach, außerdem wurden 0,5 ccm der Jodlösung zugesetzt. Aus einer Bürette ließ ich so viel destilliertes Wasser hinzulaufen, bis die Farbintensität der

[1]) *E. Ch. Grey*, Biochem. Journ. 18, 712, 1924.

ersten Abbaustufe erreicht war; darauf wurde diese Abbaustufe in derselben Weise verdünnt, bis ihre Farbintensität der der nächsten Probe gleichkam, und so fort. Aus dem Volumen des zugegebenen Wassers wurde der jeweilige Verdünnungsgrad berechnet; die so erhaltenen Zahlen ergaben die Kurven (Abb. 2).

Die Konzentration der Amyloselösung war bei allen drei Kurven annähernd dieselbe: 3 g Kartoffelstärke wurden in 100 ccm Wasser auf 56 bis 57° erwärmt. Von der abfiltrierten Lösung wurden 50 ccm mit je 5 ccm Malzauszug versetzt. 1 g Malz war bei Kurve I 25 Minuten, bei Kurve II 15 Minuten, bei Kurve III nur 5 Minuten mit 100 ccm Wasser extrahiert worden. Die Anzahl Kubikzentimeter ist von der Abszisse aus, die die Zeit in Minuten angibt, nach unten abgetragen. Auf diese Weise ist besser als bei dem Spiegelbild, das durch Abtragen nach oben entstünde, die Ähnlichkeit dieser Kurve mit derjenigen zu erkennen, die *R. Kuhn*[1]) vor kurzem bei der Messung der Maltosebildung aus Stärke und Amylose gefunden hat (nach Umrechnung auf das Gleichgewicht zwischen α- und β-Maltose). Die Kurve, die ich bei Verwendung einigermaßen starker Enzymkonzentrationen erhielt (I), entspricht der *Kuhn*schen als ganzes; bei der Kurve der schwächsten Enzymkonzentration (III) tut es nur der zweite Teil; Kurve II – mittlere Enzymkonzentration – stellt einen Übergang dar zwischen I und III. Bei Kurve III treten zwei aufeinander folgende Reaktionen deutlich hervor; die erste ist vielleicht eine Bindung zwischen Enzym und Substrat [vielleicht auch eine „Dissoziation" der von *Pringsheim*[2]) im Stärkemolekül angenommenen „assoziierten" polymeren Grundkomplexe]. Die eigentliche Depolymerisation ist wohl erst die zweite Reaktion, die die Färbbarkeit durch Jod zum Verschwinden bringt. Die scharfe Biegung der zweiten liegt um so weiter von der Abszisse entfernt, d. h. sie tritt bei einer Stufe mit um so blasserer Blaufärbung ein, je größer die angewandte Enzymkonzentration ist.

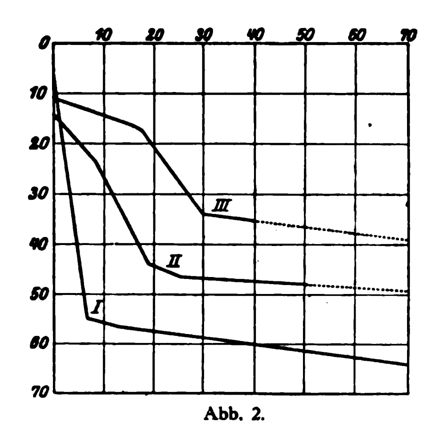


Abb. 2.

Mit Pankreasdiastase erhält man eine ähnliche Kurve bei Verwendung von 0,1 ccm Pankreatin auf 50 ccm einer 1 proz. Amylose-

[1]) *R. Kuhn*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **57**, **1965**, **1924**.
[2]) *H. Pringsheim*, Die Polysaccharide, 2. Aufl. Berlin 1923.

lösung, wenn man alle 2 Minuten eine Probe von 5 ccm mit 1 ccm n/1000 Jodlösung versetzt.

Die Vermutung, die sich bei dem Vergleich der *Kuhn*schen Kurve mit meiner aufdrängt, daß beide Reaktionen, die Maltosebildung und das Verschwinden der Jodfärbbarkeit, eng miteinander zusammenhängen möchten, läßt sich durch weitere Schlüsse bestätigen: *Kuhn* teilt die Amylasen in α- und β-Amylasen ein (nach der primären Form der durch sie entstehenden Maltose). Malzdiastase spaltet nur die β-Bindungen der Stärkegrundkomplexe, Pilz- und Pankreasdiastase nur deren α-Bindungen. Pilz- und Pankreasdiastase spalten aber keine α-glucosidischen Bindungen im üblichen Sinne des Wortes, sonst könnte das Endprodukt ihres Stärkeabbaus nicht Maltose, eine α-Glucosido-Glucose[1]), sein. Ebensowenig spaltet Malzdiastase β-glucosidische Bindungen, wie ich durch Versuche mit Lactose (β-Galactosido-Glucose) bestätigen konnte[2]). Die Resistenz der Maltose und Lactose gegen die α- bzw. β-Amylasen läßt sich nur mit Hilfe der Annahme verstehen, daß die Bindungen im Stärkemolekül, an die diese angepaßt sind, andersartig sind und anders gespalten werden als glucosidische Bindungen. Da sie sterisch wie diese α- und β-Formen darstellen, so kann der Unterschied nur in der Valenzverteilung liegen. Auch *Pringsheim* sagte kürzlich, die Bindung der Amylobiose könne sterisch eine β-glucosidische sein, obwohl sie durch Emulsin nicht angegriffen wird. Vermutlich hängt die Eigenart dieser Bindungen von den besonderen Sauerstoffringen der Di- und Trisaccharide ab, denen sie angehören.

Von diesen Sauerstoffringen bzw. den durch sie bedingten Affinitätsresten hängt nach *Bergmann* und *Ludewig*[3]) auch die Aufnahmefähigkeit für Jod ab. Das legt den Schluß nahe: die Verzuckerung der Amylose und die Zerstörung ihrer Jodfärbbarkeit sind eine und dieselbe Reaktion oder sind wenigstens voneinander abhängig.

Man könnte einwenden, daß die durch Jod färbbaren Polyamylosen, die durch Bac. macerans gebildet werden, resistent gegen Diastase sind. Meines Erachtens sind diese aber keine unveränderten Stärkeabbauprodukte, sondern verdanken ihre Entstehung einer geringfügigen Umlagerung solcher Produkte. Sie müßten sonst durch Diastase gespalten werden, besonders aber durch den Bacillus macerans selbst vergoren werden, durch den sie entstehen.

---

[1]) Nach der Nomenklatur von *H. Pringsheim*.

[2]) *Emil Fischer* hat allerdings einmal die Vermutung ausgesprochen, Aspergillusdiastase und -trehalase seien identisch, aber er bekam auch durch Malzdiastase (nicht durch Ptyalin) eine Spaltung der Trehalose (α-Glucosido-α-Glucosid). Ber. d. deutsch. chem. Ges. 28, 1429, 1895.

[3]) *M. Bergmann* und *St. Ludewig*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 57, 961, 1924.

Das Verschwinden der Aufnahmefähigkeit für Jod ist unabhängig von der zuerst auftretenden Form der Maltose, wie folgende Übersicht zeigt.

Enzym	Jodfärbung des Dextrins	Primäre Maltoseform
Malzdiastase	hellblau	β[1])
Pankreasdiastase	hellblau	α[1])
Emulsin	hellblau	nur β möglich
Pilzdiastase	rot	α[1])
Bakteriendiastase	rot	—
Ptyalin	je nach der Jodkonzentration rot oder hellblau	—

Darin liegt aber keine Schwierigkeit für die Annahme des engen Zusammenhangs zwischen dem Verschwinden der Jodfärbbarkeit und der Maltosebildung. Es ist ganz gut denkbar, daß die Möglichkeit der Färbung mit Jod aufgehoben wird, sobald die Öffnung des Ringzuckers überhaupt irgendwo erfolgt.

Das Zustandekommen der Rotfärbung auf dem anderen Abbauwege, der ja zu demselben Endprodukt führt, ist vielleicht so zu erklären: Der Faktor, der im Amylosemolekül die blaue Jodreaktion bedingt, ist in der Erythrodextrin-Abbaustufe nicht mehr vorhanden; ein zweiter Faktor, der die rote Färbung ermöglicht, ist aber noch da; er verschwindet erst beim Übergang zum Achroodextrin. Vielleicht erfolgt bei diesem Abbautypus die Depolymerisation ohne gleichzeitige Öffnung des Ringzuckers. Das Dihexosan soll sich ja auch nach *Pringsheim*[2]) mit Jodlösung burgunderrot färben. Bei der Einwirkung des Ptyalins auf Amylose scheinen beide Abbauarten nebeneinander zu verlaufen.

Zur weiteren Klärung dieser Frage wird es notwendig sein, die Verhältnisse beim Amylopektin zum Vergleich heranzuziehen. Darüber kann ich zurzeit nur folgendes sagen: Der Abbau des Amylopektins durch diastatische Fermente erfolgt viel langsamer als der der Amylose. Die Jodreaktion der Zwischenstufen beim Abbau mit Malz- und Pankreasdiastase ist in derselben Weise von der Jodkonzentration abhängig wie beim Amyloseabbau mit Ptyalin. Bei Verwendung einigermaßen starker Jodmengen bekam ich die Farbleiter: blau, violett, rot, bräunlich; mit sehr schwachen Jodmengen hingegen ergab sich nur blaue Farbe in abnehmender Intensität. Hier scheinen auch bei der Skala der verschiedenen Farben die Abbaustufen dieselbe Beziehung zum Ausgangsmaterial zu haben wie bei der Amylose. Auch hier scheint die veränderte Färbung nur auf einer Konzentrationsverminderung der färbbaren Substanz zu beruhen; die Lösung des Amylopektins (das ich nach der Ausfriermethode von *Ling* und *Nanji*[3]) dargestellt hatte) färbt sich bei Jodzusatz zunächst blau; verdünnt man sie aber sehr stark und setzt verhältnismäßig viel Jod zu, so bekommt man eine Violettfärbung, bei noch weiterer Verdünnung des Amylopektins

[1]) Nach *Kuhn*, l. c.

[2]) *H. Pringsheim* und *K. Wolfsohn*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. 57, 887, 1924.

[3]) l. c.

und noch weiterer Steigerung der Jodkonzentration entsteht unter gewissen Umständen eine Rotfärbung. Die Farbe hängt von dem Verhältnis der Jodkonzentration zur Amylopektinkonzentration ab.

Es ist demnach nicht notwendig, das Erythrodextrin als ein besonderes chemisches Individuum anzusprechen. Die Argumente, die *Biltz*[1]) für diese Annahme ins Feld führt, scheinen mir nicht beweiskräftig zu sein; er fand für die Viskosität und damit die Molekulargröße des sogenannten Erythrodextrins Werte, die zwischen denen des Amylodextrins und denen des Achroodextrins liegen. Meiner Meinung nach würde man bei den Mittelgliedern des Amyloseabbaus mit Malz, die mit keiner Jodkonzentration rot zu färben sind, ähnliche Werte finden, ja auch bei einem künstlichen Gemisch aus Amylodextrin und Achroodextrin muß das der Fall sein[2]).

Jedenfalls sind manche bisher herrschenden Unklarheiten über die mit Jod färbbaren Stufen des Stärkeabbaus dadurch aufzuhellen, daß man die beiden Teilreaktionen dieses bisher als einheitlich betrachteten Vorgangs, den Abbau der Amylose und des Amylopektins, gesondert verfolgt. Die Angaben über reduzierende Amylo- und Erythrodextrine sowie der Befund von *Biltz*[3]), daß die Verzuckerungsgeschwindigkeit beim Amylodextrin am größten, beim Achroodextrin am kleinsten sei, liegen wahrscheinlich an der Übereinanderlagerung der beiden mit verschiedener Geschwindigkeit verlaufenden Reaktionen.

Es bestätigt sich hier der von *Emil Fischer* mehrfach ausgesprochene Gedanke, daß das Studium der enzymatischen Prozesse berufen sei, die Anschauungen über den molekularen Bau komplizierter Kohlenstoffverbindungen zu vertiefen. Ich konnte meine Anschauungen nicht in allen Punkten experimentell beweisen, ich glaube aber, daß sie gegenwärtig die beste Möglichkeit zur Erklärung der beobachteten Tatsachen darstellen.

Zusammenfassung.

Zum Schluß möchte ich die gewonnenen Resultate kurz zusammenfassen.

Das mit Jod blau reagierende Polysaccharid bei Aspergillus niger v. Tgh. ist mit Amylose identisch. Glykogen ist dagegen im Gegensatz zu der Angabe von *Waterman*, auch wenn keine Amylose gebildet wird, in makrochemisch faßbaren Mengen nicht nachzuweisen. Es ist bemerkenswert, daß bei Mikroorganismen die beiden Bestandteile der Stärke der höheren Pflanzen — das Amylopektin und die Amylose —

---

[1]) *W. Biltz*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **46**, 1532.
[2]) Vgl. Biochem. Handlexikon **2**, 164. Berlin 1911.
[3]) l. c.

jedes allein auftreten, wie von dem Amylopektin [Glykogen[1])] schon lange bekannt ist. Die Amylose hatte *Pringsheim*[2]) als Isolichenin in Flechten gefunden; doch handelte es sich hier ja um eine Symbiose eines Pilzes mit grünen Algen, was eine unmittelbare Beteiligung photosynthetischer Vorgänge bei der Bildung der Amylose nicht unbedingt ausschließt, die bei Aspergillus natürlich nicht in Frage kommt.

Ergänzende Versuche über die Bedingungen der Pilzstärkebildung zeigten, daß sie in einigen bisher noch nicht daraufhin untersuchten Fällen in derselben Weise mit der Säurebildung parallel geht, wie es in anderen schon *Boas* fand. Doch scheint auch das Stickstoff-Kohlehydratverhältnis von Einfluß zu sein, indem bei Ausschluß von solchen Fällen, in denen anorganische Säure frei wird, die Bildung von Pilzstärke mit dem Sinken der Stickstoff- gegenüber der Kohlehydraternährung zunimmt. Andererseits zeigten Versuche bei verschiedener Temperatur, daß auch noch weitere, bisher unbekannte Faktoren beteiligt sein müssen.

Als Vorstufe der Pilzstärkebildung kommt vielleicht das Paradextran (Fungose) in Betracht. An der Umwandlung der Vorstufe ist ein Enzym beteiligt.

Der Abbau der Amylose durch Säuren und verschiedene Enzyme geht auf zwei verschiedenen Wegen vor sich, indem einerseits (Säure-, Pilz- und Bakteriendiastase) sich durch Jod rot färbende Abbaustufen auftreten, andererseits (Malz- und Pankreasdiastase, Emulsin) lediglich eine abnehmende Bläuung durch Jod zu beobachten ist. Dieses Verschwinden der Jodfärbbarkeit hängt wahrscheinlich mit der Maltosebildung direkt zusammen.

Es ist möglich, daß eine genauere Untersuchung dieser Verhältnisse neue Einblicke in die Chemie der Stärke und ihres Abbaus gewähren wird.

---

[1]) Vgl. *H. Pringsheim*, Ber. d. deutsch. chem. Ges. **57**, 1581, 1924.
[2]) *Derselbe*, ebendaselbst. Man vergleiche dazu die Bemerkungen oben S. 246 im Anschluß an die Feststellungen von *Karrer-Joos*.

Über die Bedeutung der Acetaldehydbildung im Froschmuskel und ihre zahlenmäßige Beziehung zur Atmung.

Von

C. Neuberg und A. Gottschalk.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biochemie in Berlin-Dahlem.)

In Fortsetzung der früheren Arbeiten von *C. Neuberg* und Mitarbeitern über das Auftreten von Acetaldehyd als Produkt der Spaltung von Zucker durch Hefe, verschiedene Pilze und Bakterien, haben *C. Neuberg* und *A. Gottschalk* für höhere Pflanzen sowie für überlebende Muskel- und Leberzellen warmblütiger Tiere gezeigt, daß auch hier eine regelmäßige Bildung von Acetaldehyd als Intermediärprodukt statthat. Vermehrung des abgefangenen Acetaldehyds unter dem Einfluß von Insulin und zugefügten abbaufähigen Kohlenhydraten hatte es uns in hohem Maße wahrscheinlich gemacht, daß vorwiegend Kohlenhydrat die Muttersubstanz dieses abgefangenen und als solchen identifizierten Acetaldehyds ist. Damit trat der Acetaldehyd als die zweite bekannte Abbaustufe des Zuckers neben die Milchsäure. Die fermentative Bildung von Milchsäure aus Kohlenhydrat durch Leber und Muskulatur ist bereits im Jahre 1877 von *Claude Bernard* mit aller Deutlichkeit erkannt worden. *O. Meyerhof* ist es dann in ausgedehnten Versuchsreihen gelungen, die völlige Äquivalenz zwischen Glykogenschwund und Milchsäureproduktion durch Muskelzellen unter den verschiedensten Bedingungen (Ruhe, Tätigkeit, Starre) zu erweisen; weiterhin erhob er den Befund, daß sich im Froschmuskelgewebe an den Spaltungsvorgang Kohlenhydrat $\longrightarrow$ Milchsäure ein oxydativer Prozeß mit dem respiratorischen Quotienten = 1 anschließt, durch den bis sechsmal mehr Milchsäure zum Verschwinden gebracht wird, als durch die verbrauchte Sauerstoffmenge oxydiert werden kann. Es wirkt also die Sauerstoffatmung

im Muskel nicht dadurch, daß sie die Produkte des Spaltungsstoffwechsels verbrennt, sondern dadurch, daß sich unter ihrem Einflusse die Milchsäure in Kohlenhydrat zurückverwandelt. Dabei obwaltet die energetische Bindung $\frac{\text{insgesamt verschwundene Milchsäure}}{\text{oxydierte Milchsäureäquivalente}} = 3$ bis 6 (Oxydationsquotient der Milchsäure). Die gleiche Beziehung ist nach *O. Warburg* bei anderen normalen tierischen Geweben sowie bei Tumoren vorhanden.

Es ist nun gelungen, mit Hilfe des *Neuberg*schen Abfangverfahrens, das sich des unlöslichen und daher die Zellen wenig schädigenden Calciumsulfits bedient, eine Zwischenstufe festzulegen, die bei der Atmung zerschnittener Froschmuskulatur[1]) durchlaufen wird, und sie in Beziehung zur Atmungsgröße zu setzen. In den nachfolgend mitgeteilten Versuchen wird gezeigt, daß unter Zugrundelegung der *Meyerhof*schen Werte für die Bildung und Oxydation von Milchsäure (bzw. einer äquivalenten Menge Zucker) *eine enge, quantitativ befriedigende Beziehung zwischen dem in der zerschnittenen Froschmuskulatur oxydierten Kohlenhydrat und dem darin tatsächlich abgefangenen Acetaldehyd besteht.*

Zu den Versuchen kamen männliche und weibliche Winterfrösche (Rana temporaria) zur Anwendung.

150 g mittelstark zerschnittener Muskulatur frisch getöteter Frösche wurden in einer Lösung suspendiert, die 225 ccm 2,4 proz. Na_2HPO_4-Lösung und 225 ccm 1,4 proz. NaH_2PO_4-Lösung enthielt ($p_H = 6,7$). Zu der Aufschwemmung wurden als Abfangmittel 10 g frisch gefällten Calciumsulfits ($CaSO_3 + 2\ H_2O$) gefügt. Dieser Ansatz wurde in einer mit Zu- und Ableitung versehenen 2-Literflasche $2\frac{1}{2}$ Stunden lang bei 15° unter ständigem Durchleiten gereinigten Sauerstoffgases mittels eines Quecksilberrührers durchgemischt. Als Sicherheitsvorlage diente ein Gefäß mit 100 ccm einer 10 proz. Kaliumbisulfitlösung.

Die Aufarbeitung geschah in der folgenden Weise: Zu dem Ansatz wurden 5 g $CaCO_3$ gegeben und ebenso 15 g zur Vorlage, wobei durch kräftiges Schütteln die Neutralisation bewirkt wurde. Außerdem wurden in die Vorlage 55 g $CaCl_2$, in wenig Wasser gelöst, eingebracht, um das gelöste K_2SO_3 in unlösliches Calciumsalz überzuzuführen. Alsdann wurden die Flüssigkeiten aus Ansatz und Vorlage vereinigt und in der früher näher beschriebenen Weise[2]) destilliert und redestilliert.

[1]) Auch mit Hilfe des von *C. Neuberg* und *E. Reinfurth* (diese Zeitschr. **106**, 281, 1920) eingeführten Abfangmittels Dimedon läßt sich aus Froschmuskelbrei Acetaldehyd anreichern, wie früher *J. Hirsch* (diese Zeitschr. **117**, 113, 1921) dargetan hat.

[2]) *C. Neuberg* und *A. Gottschalk*, diese Zeitschr. **146**, 164, 1924.

Im Enddestillat wurde der Acetaldehyd nach der *Ripper-Fürth*schen Methode quantitativ bestimmt.

In der nachfolgenden Tabelle sind die in den Versuchen ermittelten Aldehydwerte zusammengestellt und in Beziehung gesetzt zu den Zahlen von *Meyerhof*[1]) für die Bildung und Verbrennung der Milchsäure (bzw. einer äquivalenten Menge Kohlenhydrat) unter gleichen Bedingungen. Diesen zufolge entstehen aus 100 g mittelstark zerschnittener Froschmuskulatur bei 15° in gleicher Phosphatlösung innerhalb 100 Minuten 0,077 g Milchsäure. Da der Oxydationsquotient der Milchsäure in diesem Falle = 4,3 ist, so könnten aus 100 g Froschmuskelbrei unter den genannten Bedingungen in 100 Minuten theoretisch

$$\frac{0{,}077}{4{,}3} \cdot \frac{44}{90} = 8{,}7 \text{ mg Acetaldehyd}$$

erzeugt werden.

Bei den in der Tabelle aufgeführten Aldehydzahlen handelt es sich um Acetaldehyd, der innerhalb der Versuchsdauer *neu* gebildet worden ist; denn in den angestellten Kontrollen, d. h. bei der sofortigen Destillation von 150 g frisch herausgeschnittener Froschmuskulatur, konnte Acetaldahyd in quantitativ bestimmbarer Menge nicht gewonnen werden.

a 150 g Froschmuskelbrei bildeten in $2^1/_2$ Std. bei 15° und $p_H = 6{,}7$ nachgewiesene *mg Acetaldehyd*	b 100 g Froschmuskelbrei bildeten in 100 Minuten bei 15° und $p_H = 6{,}7$ *mg Acetaldehyd* (errechnet aus a)	c Unter Zugrundelegung der Standardwerte für die Bildung und Oxydation von Milchsäure (bzw. Milchsäureäquivalenten) durch Froschmuskelbrei unter gleichen Bedingungen sind demnach bei der Atmung an Acetaldehyd festgelegt worden
7,7	3,4	39,0 % der Theorie
8,3	3,7	42,5 % ,, ,,
7,9	3,5	40,2 % ,, ,,
7,3	3,2	36,7 % ,, ,,
7,6	3,4	39,0 % ,, ,,
8,8	3,9	44,8 % ,, ,,

Aus den Versuchen ergibt sich, daß zum mindesten 37 bis 45 Proz. des bei der Atmung zerschnittener Froschmuskulatur verbrennenden Kohlenhydrats (bzw. Kohlenhydratäquivalents) den Weg über Acetaldehyd nehmen. Bedenkt man, daß nur diejenige Menge des innerhalb der Zelle entstehenden Acetaldehyds fixierbar ist, die an die Außenfläche der groben Organpartikel gelangt, und daß auch dieser Teil nicht einmal vollständig erfaßt wird, da das wasserunlösliche

[1]) *O. Meyerhof*, Arch. f. d. ges. Physiol. 188, 114, 1921.

Abfangmittel ein Bodenkörper ist, so erscheint die Annahme gerechtfertigt, daß der größte Teil der während der Atmung in der Muskelzelle oxydierten Kohlenhydrate die Aldehydstufe durchläuft.

Damit ist auch für die tierische Zelle die überragende Bedeutung des Acetaldehyds für die maßgebende energieliefernde Reaktion erwiesen, die in der Oxydation von Kohlenhydraten, bzw. von Produkten ihres anoxydativen Zerfalls besteht.

Berichtigung.

In der Arbeit von *J. Schumacher*, „Zum Chemismus der Salvarsanwirkung in vivo und vitro", diese Zeitschr. **157**, 450, 1925. Zeile 20 von oben lies: „Dinatriumphenolat" statt Dichlorhydrat.

August v. Wassermann †.

Am 16. März d. J. verschied nach halbjährigem Krankenlager *August v. Wassermann.* Ihm ist das Höchste beschieden gewesen, was einem Forscher zuteil werden kann. Die große Tat, die seinen Namen trägt, ist zum Gemeingut der Völker geworden. Sie ward zum Begriff, und schon jetzt verknüpft man mit der Bezeichnung *Wassermann*sche Reaktion kaum noch die Beziehung zur Person ihres Entdeckers. Aber in der Verbindung mit seinem Namen wird diese Erkenntnis unsere Zeit und sein Leben überdauern, das mit 59 Jahren einen schmerzlich frühen Abschluß fand.

Seine Beiträge zur analytischen Unterscheidung der antibakteriellen und antitoxischen Immunität, seine Experimente über die spezifische Bindung des Tetanustoxins durch die Substanzen des Zentralnervensystems (1898), seine gleichzeitig mit *Uhlenhuth* angegebene Methode des forensischen Blutnachweises mit Hilfe der Präzipitationsreaktion (1901), seine Arbeiten mit *Citron* (1905) über die lokale Immunität, die nach dem Abklingen einer Infektionskrankheit in den betreffenden Organen sich ausbilden kann, seine Versuche zur Heilung des Mäusecarcinoms mit Eosin-Selen (1912) und die erweiterte Übertragung der nach ihm benannten Ausführungsform der Komplementbindungsreaktion zum Nachweis einer aktiven Tuberkulose (1923) haben seinen Namen eingefügt in die Reihe der Bahnbrecher auf dem Gebiete der Immunochemie.

Nichts Kleines hat dieser Mann erstrebt. Aber er war keine Natur, auf die man quälende Verpflichtungen laden durfte. Schon lange bevor ihn das Siechtum, das ihn jetzt bezwungen hat, befiel, bedrückte ihn das Mißverhältnis

zwischen der Spannweite seines Geistesfluges und der Begrenzung seiner körperlichen Kräfte. Wie eine bange Todesahnung klingt uns aus seiner letzten Schrift, der wundervollen Schilderung der Mikrobiologie während der letzten 50 Jahre, die bittere Erkenntnis entgegen, daß viele der Heroen seiner Wissenschaft, so *Pasteur*, *Paul Ehrlich* und *Behring*, Opfer ihres Berufs geworden sind, die einen in zermürbender Laboratoriumsarbeit, die anderen im Kampf mit dem Gedanken.

Gleich diesen Männern, denen er nun gefolgt ist, war es ihm vergönnt, den Zeiger an der gewaltigen Uhr des Kulturgeschehens vorzurücken und volltönende Stunden anzuschlagen im Dienste der Ewigkeit.

C. N.

Über den Einfluß einiger Intermediärprodukte auf den Gasstoffwechsel des Kaninchens.

Von

Vilém Laufberger.

Aus dem Institut für allgemeine und experimentelle Pathologie an der Masaryk-Universität in Brünn.)

(Eingegangen am 11. März 1925.)

Zweck der vorliegenden Arbeit ist es, die Beeinflussung des Stoffwechsels durch Verabreichung einiger Intermediärprodukte zu studieren. Das Verhalten des Respirationsquotienten verleiht uns die Möglichkeit, den Grad der Verbrennung dieser in manchen Fällen zu beurteilen. In dieser Richtung am längsten und gründlichsten durchforscht ist der Alkohol, dessen Respirationsquotient 0,667 beträgt, wie sowohl die Berechnung als auch der Verbrennungsversuch im Respirationsapparat ergibt.

Es ist aber nicht möglich, durch Verabreichung des Alkohols den Respirationsquotienten des Versuchstieres auf 0,667 herabzudrücken. Dies könnte wohl nur dann geschehen, wenn der Organismus ausschließlich Alkohol verbrennen könnte, was aber ausgeschlossen ist. Doch es besteht hier die Möglichkeit, aus dem Verhalten des Respirationsquotienten vor und nach der Verabreichung des Alkohols ziemlich genau den Grad seiner Verbrennung abzuschätzen. Nur dürfen wir zu diesem Zwecke kein Hungertier verwenden, dessen Respirationsquotient von ungefähr 0,7 durch den Alkohol begreiflicherweise nicht so weit geändert werden kann, um sichtbare Ausschläge zu geben. Dieses Hindernis umging zum ersten Male *Durig* dadurch, daß er den Respirationsquotienten des Versuchstieres durch Verabreichung von Glucose auf 1 erhöhte. Dann rief auch der Erwartung entsprechend der Alkohol eine deutliche Senkung des Respirationsquotienten hervor. Würde dieser bis auf 0,667 hinabgehen, so könnte man annehmen, daß

der Organismus 100 Proz. Alkohol verbrennt, bleibt er aber gleich 1, so verbrennt das Tier den Zucker ruhig weiter und macht den Alkohol auf anderem Wege unschädlich. Durch Interpolation zwischen diesen Grenzwerten kann man den Anteil sowohl des Alkohols als auch der Glucose an der Verbrennung beurteilen. Auch müssen wir noch den Umstand erwägen, daß durch den Alkohol auch noch eine Erhöhung der Sauerstoffaufnahme und des gesamten Gasstoffwechsels hervorgerufen wird. Genaue Berechnungen des Verbrennungsverhältnisses zwischen dem Alkohol und der Glucose sind wohl theoretisch möglich, haben aber praktisch keinen Sinn, da der Respirationsquotient auch unter normalen Verhältnissen gewissen kleineren Schwankungen unterworfen ist, die uns von einer genauen Berechnung abzusehen zwingen. Wir werden uns also mit einer ungefähren Schätzung begnügen müssen.

Mit einer ähnlichen Methodik wie bei der Untersuchung der Alkoholwirkung kann man auch an das Studium des Verhaltens anderer Intermediärprodukte herantreten, wobei wir diese Stoffe in solche mit hohem und niedrigem theoretisch berechneten Respirationsquotienten einteilen können. Bei den letzteren betreten wir denselben Weg, wie bei der Untersuchung der Alkoholwirkung. Der Einfluß der ersteren wird sich dagegen nur dann deutlich zeigen, wenn sie Hungertieren mit niedrigen Respirationsquotienten verabreicht werden, da sie dann, wie z. B. das Dioxyaceton, deutliche Ausschläge geben werden. Von diesen Überlegungen gingen wir bei unseren Versuchen aus. Ob die Bezeichnung Intermediärprodukte für alle von uns verwendeten Stoffe in des Wortes engster Bedeutung richtig ist, das zu entscheiden wäre allein mit einem dem *Neuberg*schen analogen Abfangverfahren möglich, welches bei der Feststellung des Acetaldehyds in den Geweben so schöne Resultate ergab. Solange es bei den übrigen von uns untersuchten Stoffen nicht gelingen wird, einen ähnlich wirkenden Abfänger zu finden, wird ihre Intermediärnatur mehr oder weniger strittig bleiben. Trotzdem kann es vielleicht auf einem indirekten, den einzelnen Stoffen angepaßten Wege gelingen, die Frage der Beziehungen dieser Stoffe zum intermediären Stoffwechsel wenigstens ein wenig zu klären.

Die bei unseren Versuchen verwendeten Kaninchen wurden sämtlich schon längere Zeit zu Bestimmungen des Gasstoffwechsels benutzt. Dieser Umstand ist deshalb wichtig, weil bei den Tieren mit der Zeit eine Gewöhnung an die Verhältnisse in der Respirationskammer eintritt, die für das Gelingen des Versuchs von großer Bedeutung ist. Um die Bewegungen des Tieres möglichst zu verhindern, bedienten wir uns eines engen Glaszylinders von der Form, wie sie zur Aufbewahrung anatomischer Präparate Verwendung findet, als Respirationskammer. Außerdem läßt der *Krogh*sche Registrationsapparat noch die Kontrolle der etwa vorkommenden Bewegungen des Versuchstieres zu. Anwendung

fand das Prinzip der Sauerstoffzirkulation nach *Regnault-Reiset*. Der verbrauchte Sauerstoff wurde mit einem *Krogh*schen Spirometer von 2 Liter Inhalt registriert. Die ausgeschiedene Kohlensäure wurde absorbiert und durch Wägung bestimmt. Der Gasstrom wurde durch Motorantrieb aufrecht erhalten. Im Gegensatz zu den Angaben älterer Autoren fanden wir den Einfluß der Darmgase unbedeutend, denn das Ammoniak, der nach *Formánek* am störendsten wirkt, wird im Schwefelsäuregefäß aufgefangen. Eine Bleiacetatlösung hält den Schwefelwasserstoff auf. Gelegentlich vorgenommene Analysen zeigten auch, daß den brennbaren Gasen jede Bedeutung abgesprochen werden kann. Aus unserem großen Versuchsmaterial führen wir hier eine Auswahl von Protokollen in Form von Tabellen an.

Tabelle I.

Versuch vom 9. September 1924. Kaninchen Nr. 45, Geschlecht ♂, Gewicht 1400 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 21° C. Barometerstand 731. *Ohne Injektion.* Temperatur der Respirationskammer 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 38,2° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
9h — 9h 30′	0,560	0,45	0,407	0,557	0,730
9 30′—10	0,560	0,44	0,407	0,545	0,747
10 —10 30	0,540	0,44	0,392	0,545	0,720
10 30—11	0,630	0,43	0,458	0,532	0,860
11 —11 30	0,580	0,44	0,421	0,545	0,773
11 30—12	0,580	0,44	0,421	0,545	0,773
12 —12 30	0,610	0,44	0,443	0,545	0,813
12 30—13	0,610	0,42	0,443	0,520	0,852
13 —13 30	0,580	0,44	0,421	0,545	0,773

Diese Tabelle illustriert uns das Verhalten des Gasstoffwechsels eines *Normaltieres*. Trotzdem dieser Versuch als gelungen anzusehen ist, bemerken wir doch Schwankungen der Gasaufnahme und Ausscheidung. Außer solchen Normalversuchen habe ich noch mit dieser Methodik solche angestellt, die durch das Herausnehmen des Tieres aus der Respirationskammer, durch das Einführen einer Magensonde mit und ohne Injektion von Wasser in den Magen, durch subkutane Injektion von Ringerlösung und ähnliches den Gasstoffwechsel zu ändern versuchten. Solche mehr oder weniger mechanische Eingriffe führen zu keinen deutlichen Veränderungen des Gasstoffwechsels, und die sich auch hier einstellenden geringen Schwankungen, die übrigens nicht sehr bedeutend sind, werden charakterisiert durch ihre Unregelmäßigkeit.

In der ersten Versuchsreihe untersuchten wir das Verhalten des Gasstoffwechsels nach der Einverleibung von *Glucose und Alkohol*. Die Tabellen II bis V zeigen uns einige Ergebnisse.

Tabelle II.

Versuch vom 11. Oktober 1924. Kaninchen Nr. 44, Geschlecht ♂. Gewicht 1600 g. Nicht gehungert, vor dem Versuche wurden oral 15 g *Glucose* verabreicht. Laboratoriumstemperatur 17° C. Barometerstand 734. Temperatur der Respirationskammer 29° C. Um 9 Uhr 30 Minuten wurden 5 ccm *Alkohol* mit 15 ccm Wasser in den Magen eingeführt. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 37,7° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	0,920	0,55	0,585	0,618	0,946
8 30′— 9	1,090	0,53	0,693	0,596	1,163
9 — 9 30	1,190	0,62	0,757	0,697	1,086
9 30—10	1,220	0,67	0,776	0,753	1,030
10 —10 30	1,040	0,67	0,661	0,753	0,878
10 30—11	0,940	0,62	0,598	0,697	0,857
11 —11 30	0,960	0,60	0,610	0,674	0,905
11 30—12	1,230	0,64	0,782	0,719	1,087
12 —12 30	1,130	0,69	0,719	0,776	0,926
12 30—13	1,000	0,66	0,633	0,742	0,857

Vor dem Versuch verabreichte Glucose erhöht den Respirationsquotient auf 1. Werden dann 5 ccm Alkohol gegeben, so sinkt der Respirationsquotient auf 0,85, welche Wirkung 1½ Stunden dauert. Bei einer größeren Menge dauert die Senkung des Respirationsquotienten viel länger.

Diese Versuche bewiesen uns die hinlängliche Genauigkeit und Verläßlichkeit der angewandten Methodik. So schritten wir denn an die Untersuchung bisher in dieser Weise nicht behandelter Probleme heran. Zunächst untersuchten wir den *Einfluß niedriger Temperaturen*. Während die oben angeführten Versuche beim thermischen Neutralpunkt von 29° C durchgeführt wurden, stellten wir weitere Experimente bei einer Temperatur von 8 bis 12° C an. Denn es erschien uns möglich, daß unter Umständen, unter denen ein großer Teil des Stoffwechsels zum Ersatz der an die Umgebung verlorenen Wärmemengen dient, ein ganz anderes Verhältnis zwischen den verbrannten Nahrungsstoffen eintreten wird als beim thermischen Neutralpunkt. Wie die Tabellen III, IV, V zeigen, tritt eine solche Verschiebung nicht ein, mit anderen Worten, das Verhältnis der Glucose und des Alkohols ändert sich unter dem Einfluß der Außentemperatur nicht. Ein beim Kaninchen Nr. 38 ohne Injektion unter sonst gleichen Bedingungen bei 8° C unter-

nommener Versuch, der hier nicht angeführt ist, weist als größten Sauerstoffverbrauch pro Stunde und Kilogramm Körpergewicht 890 ccm auf, was einen vielleicht etwas erhöhten, sonst aber nicht veränderten kalorischen Umsatz beweist.

Tabelle III.

Versuch vom 4. November 1924. Kaninchen Nr. 37, Geschlecht ♀, Gewicht 1950 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 23,4° C. Barometerstand 743. 9 Uhr 30 Minuten wurden 15 g *Glucose* und 10 ccm *Alkohol* in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 10° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 37,1° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	1,10	0,89	0,574	0,794	0,722
8 30′— 9	1,35	0,98	0,704	0,875	0,805
9 — 9 30	1,41	0,99	0,736	0,884	0,832
9 30—10	1,06	0,95	0,553	0,848	0,652
10 —10 30	1,43	1,01	0,746	0,902	0,827
10 30—11	1,46	1,06	0,762	0,946	0,805
11 —11 30	1,59	1,08	0,830	0,964	0,860
11 30—12	1,68	1,15	0,877	1,024	0,854
12 —12 30	1,52	1,04	0,793	0,928	0,854
12 30—13	1,73	1,16	0,903	1,036	0,871

Tabelle IV.

Versuch vom 6. November 1924. Kaninchen Nr. 38, Geschlecht ♂, Gewicht 1690 g. 48 Stunden gehungert. Vor dem Versuche wurden 15 g *Glucose* per os einverleibt. Laboratoriumstemperatur 23,4° C. Barometerstand 742. 9 Uhr 30 Minuten wurden 6 ccm *Alkohol* in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 10° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 37,9° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	0,990	0,70	0,596	0,720	0,827
8 30′— 9	1,320	0,80	0,795	0,823	0,965
9 — 9 30	1,430	0,84	0,861	0,864	0,996
9 30—10	1,070	0,80	0,644	0,823	0,782
10 —10 30	1,120	0,82	0,674	0,843	0,781
10 30—11	1,230	0,81	0,740	0,833	0,888
11 —11 30	1,330	0,88	0,801	0,905	0,884
11 30—12	1,380	0,90	0,831	0,926	0,897
12 —12 30	1,350	0,85	0,813	0,885	0,918
12 30—13	1,520	0,94	0,915	0,967	0,946
13 —13 30	1,490	0,93	0,897	0,957	0,937
13 30—14	1,480	0,92	0,891	0,946	0,941

Tabelle V.

Versuch vom 8. November 1924. Kaninchen Nr. 42, Geschlecht ♂, Gewicht 1830 g. 48 Stunden gehungert. Vor dem Versuche wurden 15 g *Glucose* einverleibt. Laboratoriumstemperatur 23° C. Barometerstand 742. Um 9 Uhr wurden 10 ccm *Alkohol* in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 10° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 37° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	1,010	0,78	0,561	0,742	0,756
8 30′— 9	1,140	0,73	0,634	0,695	0,912
9 — 9 30	1,250	0,91	0,695	0,866	0,802
9 30 —10	1,360	0,94	0,756	0,895	0,845
10 —10 30	1,110	0,89	0,617	0,847	0,728
10 30 —11	1,180	0,84	0,656	0,800	0,820
11 —11 30	1,230	0,83	0,684	0,790	0,865
11 30 —12	1,300	0,90	0,723	0,857	0,843
12 —12 30	1,550	1,04	0,862	0,990	0,870

Daraus können wir also schließen, daß der Alkohol kein Stoff ist, der vom Organismus zur Bestreitung von Wärmeverlusten in bevorzugender Weise herangezogen würde.

Ein ganz klares Resultat ergeben Experimente mit dem *Dioxyaceton*. Wir verwendeten das von *Meister*, *Lucius* und *Brüning* nach dem Vorschlag von *Isaac* hergestellte Präparat, das unter dem Namen Oxanthin im Handel ist. Respirationsversuche mit diesem Stoffe wurden übrigens auch von *Isaac* bereits angekündigt.

Tabelle VI.

Versuch vom 17. September 1924. Kaninchen Nr. 37, Geschlecht ♀, Gewicht 1640 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 20° C. Barometerstand 740. 9 Uhr 30 Minuten wurden 15 g *Oxanthin* mit 20 ccm Wasser in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 38,1° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h 30′— 9h	0,700	0,53	0,434	0,570	0,761
9 — 9 30′	0,730	0,55	0,453	0,592	0,765
9 30 —10	1,030	0,64	0,639	0,689	0,928
10 —10 30	0,950	0,64	0,589	0,689	0,856
10 30 —11	0,990	0,64	0,614	0,689	0,892
11 —11 30	0,910	0,57	0,564	0,613	0,920
11 30 —12	1,060	0,65	0,659	0,699	0,940
12 —12 30	0,940	0,58	0,583	0,624	0,934

Tabelle VII.

Versuch vom 18. September 1924. Kaninchen Nr. 33, Geschlecht ♂, Gewicht 1810 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 20° C. Barometerstand 740. 9 Uhr 30 Minuten wurden 10 g *Oxanthin* mit 15 ccm Wasser in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 37,9° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	0,630	0,50	0,354	0,487	0,726
8 30′— 9	0,570	0,47	0,320	0,458	0,699
9 — 9 30	0,620	0,47	0,348	0,458	0,760
9 30 —10	0,970	0,62	0,545	0,604	0,902
10 —10 30	0,910	0,57	0,511	0,556	0,920
10 30 —11	0,790	0,50	0,444	0,487	0,911
11 —11 30	0,970	0,56	0,545	0,546	0,998
11 30 —12	0,880	0,56	0,495	0,546	0,906
12 —12 30	0,790	0,55	0,444	0,536	0,828
12 30 —13	0,760	0,52	0,427	0,507	0,848

Tabelle VIII.

Versuch vom 19. August 1924. Kaninchen Nr. 33, Geschlecht ♂, Gewicht 1430 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 20° C. Barometerstand 740. Um 10 Uhr wurden 10 g *Oxanthin* mit 10 ccm Wasser in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 9° C. In der letzten halben Stunde ist das Tier sehr unruhig. Körpertemperatur nach dem Versuche 37,4° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h 30′— 9h	0,750	0,59	0,533	0,731	0,729
9 — 9 30′	0,910	0,64	0,647	0,793	0,816
9 30 —10	0,900	0,63	0,640	0,781	0,820
10 —10 30	0,970	0,64	0,690	0,793	0,870
10 30 —11	1,080	0,62	0,768	0,768	1,000
11 —11 30	1,070	0,65	0,761	0,806	0,944
11 30 —12	1,170	0,62	0,832	0,768	1,083
12 —12 30	1,030	0,62	0,733	0,768	0,953
12 30 —13	1,270	0,80	0,904	0,992	0,911

Nach unseren Ergebnissen erhöht das Dioxyaceton den Respirationsquotienten von 0,7 auf 1. Diese Erhöhung dauert während des ganzen Versuchs, d. h. also 4 Stunden. Daraus ergibt sich, daß sich das Dioxyaceton in hervorragender Weise an der Deckung des Energiebedarfs beteiligt, denn da nach der Formel:

$$HOCH_2-CO-CH_2OH + 6O = 3CO_2 + 3H_2O$$

Tabelle IX.

Versuch vom 30. September 1924. Kaninchen Nr. 44. Geschlecht ♂. Gewicht 1490 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 18° C. Barometerstand 738. 9 Uhr 30 Minuten wurden 10 g *Oxanthin* mit 15 ccm Wasser in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 8° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 37,6° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	0,900	0,61	0,614	0,728	0,844
8 30′— 9	0,900	0,63	0,614	0,751	0,817
9 — 9 30	0,950	0,66	0,649	0,787	0,824
9 30—10	1,130	0,81	0,772	0,966	0,798
10 —10 30	1,130	0,69	0,772	0,823	0,937
10 30—11	1,090	0,65	0,744	0,775	0,960
11 —11 30	1,180	0,65	0,806	0,775	1,039
11 30—12	1,090	0,65	0,744	0,775	0,960
12 —12 30	1,140	0,65	0,778	0,775	1,004
12 30—13	1,050	0,67	0,717	0,799	0,897

der Respirationsquotient für die Verbrennung dieses Stoffes gleich 1 ist und sich der gefundene Wert dieser Zahl nähert, erscheint eine solche Annahme sehr berechtigt. Der Sauerstoffverbrauch bzw. die kalorische Produktion wird durch das Dioxyaceton ebenfalls erhöht, was besonders der bei 29° C vorgenommene Versuch schön hervortreten läßt. Es zeigt also das Dioxyaceton eine spezifisch-dynamische Wirkung, welche von ungefähr gleicher Größe ist wie die mit unserer Versuchsanordnung für die Glucose festgestellte.

Auch der *Bernsteinsäure* wird von vielen Seiten eine bedeutende Rolle im intermediären Stoffwechsel zugeschrieben. Ich weise hier nur auf die Hypothese *Knoops* hin, nach der zwei Essigsäurereste sich zu einem Molekül Bernsteinsäure verbinden. Auch wird von der letzteren behauptet, daß sie vom Organismus verbrannt wird. Eine sogar vollkommene Verbrennung bei seinen Tierversuchen behauptet *Marfori* beobachtet zu haben. *Otha* gibt an, daß die mit Bernsteinsäurelösung durchspülte Hundeleber Acetonkörper bildet; doch scheint das letztere jedenfalls nicht ganz sicher zu sein.

Die Verbrennungsformel

$$HOOC-CH_2-CH_2-COOH + 7\,O = 4\,CO_2 + 3\,H_2O$$
$$\text{Respirationsquotient} = 1{,}14$$

ergibt, daß der Respirationsquotient bei der Bernsteinsäureoxydation zu hoch wäre, um sich dem Nachweis im Respirationsversuch zu entziehen. Beide an Hungertieren vorgenommenen Versuche weisen keine Erhöhung des Respirationsquotienten auf. Der Sauerstoffverbrauch hingegen steigt beträchtlich, was darauf hinweist, daß die Bernstein-

säure in den Zellstoffwechsel eingreift. Auch der Versuch am gefütterten Tiere, sowie der Versuch nach Glucoseverabreichung, weisen keine Erhöhung des Respirationsquotienten auf. Bei letzterem hätte sich auch eine solche nicht erwarten lassen, da sowohl die Glucose als auch die Bernsteinsäure einen hohen Respirationsquotienten besitzen. Im Gegenteil scheint die Erhöhung des Respirationsquotienten für eine Gabe von 20 g Glucose nicht genügend zu sein, was als Beweis dafür angesehen werden könnte, daß die Bernsteinsäure eine erhöhte Fettverbrennung veranlaßt.

Tabelle X.

Versuch vom 11. Februar 1925. Kaninchen Nr. 33, Geschlecht ♂, Gewicht 2410 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 24° C. Barometerstand 740. Um 10 Uhr wurden 5 g *Bernsteinsäure* in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 38,3° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	0,750	0,57	0,316	0,408	0,774
8 30′— 9	0,810	0,60	0,342	0,430	0,795
9 — 9 30	0,720	0,56	0,304	0,401	0,757
9 30 —10	0,680	0,55	0,287	0,394	0,728
10 —10 30	0,820	0,65	0,346	0,446	0,742
10 30—11	0,900	0,68	0,380	0,487	0,779
11 —11 30	0,880	0,63	0,371	0,451	0,822
11 30—12	0,860	0,65	0,363	0,466	0,779
12 —12 30	0,790	0,63	0,333	0,451	0,738
12 30—13	0,900	0,67	0,380	0,480	0,791

Tabelle XI.

Versuch vom 30. Januar 1925. Kaninchen Nr. 44, Geschlecht ♂, Gewicht 2050 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 25° C. Barometerstand 736. Um 10 Uhr wurden 5 g *Bernsteinsäure* in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 38,3° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h 30′— 9h	0,790	0,53	0,392	0,444	0,883
9 — 9 30′	0,650	0,53	0,322	0,444	0,727
9 30 —10	0,700	0,51	0,347	0,427	0,813
10 —10 30	0,730	0,60	0,362	0,502	0,721
10 30 —11	0,720	0,65	0,357	0,544	0,656
11 —11 30	0,830	0,70	0,412	0,586	0,702
11 30 —12	0,790	0,59	0,391	0,494	0,793
12 —12 30	0,840	0,71	0,417	0,594	0,701
12 30 —13	0,820	0,65	0,407	0,544	0,747

Tabelle XII.

Versuch vom 3. Februar 1925. Kaninchen Nr. 38. Geschlecht ♀, Gewicht 2220 g. Nicht gehungert. Laboratoriumstemperatur 26° C. Barometerstand 744. Um 10 Uhr wurden 5 g *Bernsteinsäure* in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 38,3° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	1,180	0,67	0,541	0,516	1,048
8 30′— 9	0,960	0,60	0,440	0,462	0,952
9 — 9 30′	1,030	0,66	0,472	0,508	0,928
9 30 —10	1,030	0,65	0,472	0,500	0,943
10 —10 30	1,100	0,66	0,504	0,508	0,991
10 30 —11	1,060	0,68	0,486	0,523	0,927
11 —11 30	1,200	0,75	0,550	0,577	0,952
11 30 —12	1,080	0,63	0,495	0,485	1,020
12 —12 30	1,170	0,73	0,536	0,562	0,954

Tabelle XIII.

Versuch vom 5. Februar 1925. Kaninchen Nr. 44, Geschlecht ♂, Gewicht 2060 g. 24 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 26° C. Barometerstand 746. Um 10 Uhr wurden 5 g *Bernsteinsäure* mit 20 g Glucose in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 38,3° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	0,810	0,54	0,400	0,449	0,890
8 30′— 9	0,680	0,52	0,336	0,432	0,776
9 — 9 30	0.600	0,52	0,296	0,432	0,684
9 30 —10	0,670	0,50	0,331	0,416	0,795
10 —10 30	0,830	0,54	0,410	0,449	0,912
10 30 —11	1,000	0,65	0,494	0,541	0,913
11 —11 30	0,980	0,67	0,484	0,557	0,868
11 30 —12	0,940	0,58	0,464	0,482	0,961
12 —12 30	0,960	0,64	0,474	0,532	0,890
12 30 —13	0,970	0.60	0,419	0,459	0,959

Den Grund für das ganz negative Resultat der Versuche mit Bernsteinsäure könnten wir vielleicht in ihrer diuretischen Wirkung sehen. Alle unsere Versuchstiere wiesen eine reichliche und häufige Diurese auf, trotzdem selbstverständlich die Bernsteinsäure vor der Verabreichung neutralisiert wurde. Auch wenn die Diurese von der Säurenatur der Bernsteinsäure abhängig wäre, so könnte sie keineswegs so ausgiebig sein, da sie doch eine zweibasische Säure ist. Der Harn gibt übrigens sowohl bei den Versuchs- als auch bei den Normaltieren

die Fichtenspanreaktion, so daß aus dieser nichts geschlossen werden kann. Es könnte also nur die etwas komplizierte quantitative Bestimmung Klarheit über die Ausscheidungsverhältnisse bringen. An Hunden angestellte Versuche führten auch zu keinem Resultat. Denn nach oraler Verabreichung erbrachen diese Tiere die Bernsteinsäure. Auch nach subkutaner Injektion trat im Verlauf von 2½ Stunden keine Erhöhung des Respirationsquotienten ein. Wichtig ist, daß bei Hunden die diuretische Wirkung der Bernsteinsäure ausblieb.

Tabelle XIV.

Versuch vom 16. Februar 1925. Hund „Tschokel", Geschlecht ♀, Gewicht 7600 g. Nicht gehungert. Laboratoriumstemperatur 24° C. Barometerstand 730. Um 9 Uhr subkutane Injektion von 5 g *Bernsteinsäure.*

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h 24′— 8h 30′	0,460	0,40	0,308	0,447	0,686
8 54 — 9	0,530	0,45	0,354	0,504	0,703
9 24 — 9 30	0,380	0,39	0,254	0,437	0,582
9 54 —10	0,460	0,41	0,308	0,459	0,670
10 24 —10 30	0,410	0,38	0,273	0,425	0,644
10 54 —11	0,430	0,38	0,286	0,425	0,675
11 24 —11 30	0,440	0,38	0,293	0,425	0,691

Wir können also auf Grund unserer Versuche nicht mit der Behauptung *Marforis* übereinstimmen. Denn wenn die Bernsteinsäure nach ihrer Verabreichung nicht im Harn erscheinen sollte, so können wir zwar behaupten, daß sie quantitativ verbrannt wird, aber nicht, daß dies vollkommen geschieht. Denn im letzteren Falle, d. h. also, wenn die Verbrennung bis zu den Endprodukten CO_2 und H_2O fortschreiten würde, müßte sich dieser Vorgang klar im Respirationsquotienten spiegeln. Es ist also hier unbedingt nötig, die Begriffe der vollkommenen und der quantitativen Verbrennung scharf auseinander zu halten. Es wurde schon gesagt, daß die erste ausgeschlossen werden kann. Die Möglichkeit, daß die Bernsteinsäure als solche oder als Abbauprodukt irgendwelcher Art im Harn ausgeschieden wird, kann nur durch die Harnanalyse ausgeschlossen werden. Es erscheint aber schließlich nicht ausgeschlossen, daß die Bernsteinsäure, ohne tiefergreifende Veränderungen ihres Moleküls durchzumachen, besonders aber ohne Abspaltung von Kohlenstoff oder Sauerstoff, der Synthese zu einem komplizierteren Molekül anheimfällt. Auf Grund unserer Versuche allein können wir also die Intermediärnatur der Bernsteinsäure keineswegs bestreiten, wir können nur behaupten, daß sie nicht bis ans Ende zu Kohlensäure und Wasser verbrannt wird.

Der Einfluß der *Brenztraubensäure*, welche zuerst von *Neuberg* als Intermediärprodukt für den vegetabilischen Stoffwechsel in den Vordergrund gestellt worden war, ist der Gegenstand unserer weiteren Untersuchungen. Der theoretische Respirationsquotient dieser Säure ist

$$CH_3-CO-COOH + 5O = 3CO_2 + 2H_2O$$

Respirationsquotient = 1,2.

Man konnte also im Falle der Verbrennung eine bedeutende Erhöhung des Respirationsquotienten erwarten. Eine Steigerung fand zwar statt, war aber keineswegs bedeutend.

Tabelle XV.

Versuch von 18. August 1924. Kaninchen Nr. 36, Geschlecht ♀, Gewicht 2460 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 22° C. Barometerstand 733. Um 9 Uhr intravenöse Injektion von 3 g *Brenztraubensäure*. Temperatur der Respirationskammer 9,5° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 37,8° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	1,550	1,23	0,652	0,879	0,741
8 30′— 9	1,560	1,22	0,656	0,871	0,752
9 — 9 30	1,400	1,18	0,588	0,844	0,698
9 30—10	1,810	1,36	0,761	0,964	0,783
10 —10 30	1,860	1,30	0,778	0,929	0,841
10 30—11	1,710	1,25	0,719	0,893	0,804
11 —11 30	1,570	1,16	0,625	0,828	0,786
11 30—12	1,770	1,29	0,744	0,922	0,807

Tabelle XVI.

Versuch vom 10. Oktober 1924. Kaninchen Nr. 38, Geschlecht ♂, Gewicht 1580 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 18° C. Barometerstand 740. 9 Uhr 30 Minuten wurden 5 ccm *Brenztraubensäure* in 45 ccm Wasser gelöst in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 38,2° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	0,690	0,47	0,444	0,530	0,837
8 30′— 9	0,630	0,46	0,405	0,519	0,781
9 — 9 30	0,610	0,45	0,393	0,507	0,773
9 30—10	0,840	0,54	0,541	0,609	0,888
10 —10 30	0,860	0,54	0,554	0,609	0,909
10 30—11	0,730	0,54	0,470	0,609	0,771
11 —11 30	0,770	0,50	0,496	0,564	0,879
11 30—12	0,790	0,53	0,509	0,598	0,851
12 —12 30	0,830	0,55	0,534	0,620	0,861
12 30—13	0,810	0,60	0,521	0,677	0,770

Tabelle XVII.

Versuch vom 26. Februar 1924. Kaninchen Nr. 33, Geschlecht ♂, Gewicht 2280 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 21° C. Barometerstand 730. Um 10 Uhr wurden 5 ccm *Brenztraubensäure* in 45 ccm Wasser gelöst in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 39° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	0,770	0,59	0,343	0,448	0,767
8 30′— 9	0,660	0,55	0,294	0,417	0,705
9 — 9 30	0,650	0,53	0,283	0,402	0,704
9 30 —10	0,690	0,55	0,308	0,417	0,737
10 —10 30	0,890	0,65	0,397	0,493	0,804
10 30 —11	0,790	0,65	0,352	0,493	0,714
11 —11 30	0,910	0,70	0,406	0,531	0,764
11 30 —12	1,290	0,88	0,576	0,668	0,861
12 —12 30	1,070	0,72	0,477	0,546	0,873
12 30 —13	0,780	0,70	0,348	0,531	0,654

Dasselbe Resultat ergab auch der Versuch mit der intravenösen Injektion der Brenztraubensäure.

Bekanntlich wird diese von vielen Forschern als Intermediärprodukt angesehen, obwohl Beweise für eine solche Anschauung sich mehr auf den Stoffwechsel des Hefepilzes als der Säugetiere beziehen. Weiter auf die sehr umfangreiche Literatur hier einzugehen, wäre überflüssig.

Im Versuch Nr. 16 steigt in der ersten Stunde nach der Injektion der Respirationsquotient auf 0,9, also ziemlich bedeutend, und kehrt dann wieder zur ursprünglichen Höhe zurück. Dies ist ein Beweis, daß die Brenztraubensäure tatsächlich verbrannt wird. Ihre Verbrennung hängt wohl von den Resorptionsverhältnissen ab, denn im Versuch Nr. 17 steigt der Respirationsquotient und auch der Sauerstoffverbrauch später. Im Vergleich zum Dioxyaceton ruft also die Brenztraubensäure eine viel kürzer dauernde und geringere Erhöhung des Respirationsquotienten hervor.

Vom Standpunkt des intermediären Stoffwechsels können wir also folgendes sagen. Nach der Verabreichung der Brenztraubensäure, die sich als Übergangsprodukt unter normalen Verhältnissen im Körper nicht in größerer Menge vorfindet, im Überschuß, wird ein Teil im Harn ausgeschieden (der strikte Beweis für diese Anschauung ist allerdings nicht erbracht). Der andere Teil wird in den intermediären Stoffwechsel hineingerissen und in geringer Menge direkt verbrannt, der Rest synthetisch weiterverarbeitet. Diese Synthese verläuft wahrscheinlich, wie neuerdings wieder von *Meyerhof* behauptet wird, über die Milchsäure zur Glucose. Dieser Vorgang muß selbstverständlich nicht mit einer Erhöhung des Respirationsquotienten verbunden sein.

Die *Milchsäure* stellt gerade die Hälfte eines Glucosemoleküls dar und hat folglich auch den theoretischen Respirationsquotienten gleich 1. Wir benutzten inaktive neutralisierte Milchsäure, die wir per os in einer Menge von 5 g verabreichten. Eine Steigerung des Respirationsquotienten konnten wir in keinem Falle feststellen. Auch die spezifisch-dynamische Wirkung war nicht bedeutend.

Tabelle XVIII.

Versuch vom 29. August 1924. Kaninchen Nr. 38, Geschlecht ♂, Gewicht 1350 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 20° C. Barometerstand 735. 9 Uhr 30 Minuten wurden 5 g *Milchsäure* (neutralisiert) in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 28° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 36,8° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	0,530	0,43	0,399	0,558	0,715
8 30′— 9	0,550	0,38	0,414	0,493	0,840
9 — 9 30	0,560	0,46	0,422	0,597	0,707
9 30—10	0,550	0,47	0,414	0,610	0,678
10 —10 30	—	—	—	—	—
10 30—11	0,790	0,53	0,595	0,688	0,865
11 —11 30	0,710	0,51	0,535	0,662	0,808
11 30—12	0,630	0,49	0,475	0,636	0,746
12 —12 30	0,760	0,55	0,573	0,714	0,802

Tabelle XIX.

Versuch vom 30. August 1924. Kaninchen Nr. 34, Geschlecht ♀, Gewicht 1500 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 20° C. Barometerstand 735. Um 9 Uhr wurden 5 g *Milchsäure* (neutralisiert) in den Magen eingeflößt. Temperatur des Respirationsgefäßes 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 39° C.

Am zweiten Tage nach dem Versuche gestorben.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	0,580	0,47	0,393	0,549	0,716
8 30′— 9	0,620	0,49	0,420	0,572	0,735
9 — 9 30	0,620	0,49	0,420	0,572	0,735
9 30—10	0,660	0,50	0,447	0,584	0,766
10 —10 30	0,710	0,50	0,478	0,584	0,818
10 30—11	0,680	0,54	0,451	0,631	0,714
11 —11 30	—	—	—	—	—
11 30—12	0,770	0,50	0,522	0,584	0,894

Die Tatsache, daß der Respirationsquotient nach Verabreichung von inaktiver Milchsäure nicht erhöht wird, kann vielleicht so erklärt werden, daß diese ale körperfremder Stoff nicht verbrannt. sondern

ausgeschieden wird. Wenn ein Teil aber an dem Stoffwechsel teilnehmen sollte, so könnte er zur Synthese von Kohlenhydraten herangezogen werden, wodurch der Respirationsquotient natürlich nicht verändert wird.

Das Glycerin, mit welchem wir uns weiter beschäftigten, stellt einen für unsere Methodik ungeeigneten Stoff dar, weil sein Respirationsquotient 0,84 beträgt, und die durch dieses hervorgerufenen Veränderungen des Respirationsquotienten deshalb geringe sein müssen, ob dieser nun ursprünglich hoch oder niedrig war. Dies zeigen die angeführten Versuche deutlich.

Tabelle XX.

Versuch vom 24. Oktober 1924. Kaninchen Nr. 33, Geschlecht ♂, Gewicht 1950 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 20° C. Barometerstand 745. 9 Uhr 30 Minuten wurden 10 g *Glycerin* in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 38° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	0,750	0,47	0,391	0,428	0,913
8 30′— 9	0,760	0,48	0,396	0,437	0,906
9 — 9 30	0,830	0,43	0,433	0,392	1,105
9 30—10	0,860	0,55	0,449	0,501	0,895
10 —10 30	0,860	0,56	0,449	0,510	0,879
10 30—11	0,910	0,53	0,475	0,483	0,983
11 —11 30	0,890	0,45	0,464	0,410	1,133
11 30—12	0,780	0,52	0,407	0,476	0,859
12 —12 30	0,760	0,50	0,396	0,455	0,870

Tabelle XXI.

Versuch vom 25. Oktober 1924. Kaninchen Nr. 37, Geschlecht ♀, Gewicht 1880 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 20° C. Barometerstand 743. Um 9 Uhr wurden 10 g *Glucose* und 10 g *Glycerin* in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 38,3° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	0,880	0,57	0,476	0,536	0,888
8 30′— 9	0,810	0,57	0,438	0,536	0,818
9 — 9 30	0,850	0,65	0,460	0,611	0,752
9 30—10	1,070	0,67	0,579	0,630	0,919
10 —10 30	1,350	0,84	0,731	0,790	0,925
10 30—11	1,170	0,72	0,633	0,677	0,935
11 —11 30	0,870	0,61	0,471	0,573	0,821
11 30—12	1,140	0,70	0,617	0,658	0,937

Der Versuch, bei dem Glucose und Glycerin (Tabelle XXI) verabreicht wurde, weist eine besonders große spezifisch-dynamische Wirkung beider Stoffe auf.

Bei der Untersuchung der Wirkung des *Äthylenglykols* gaben wir letzteres sowohl als intravenöse Injektion (Tabelle XXII), als auch per os (Tabellen XXIII, XXIV). Im letzten Versuch wurde auch gleichzeitig Glucose gegeben.

Tabelle XXII.

Versuch vom 26. August 1924. Kaninchen Nr. 33, Geschlecht ♂, Gewicht 1900 g. 48 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 20° C. Barometerstand 736. - 9 Uhr 30 Minuten intravenöse Injektion von 1 ccm *Äthylenglykol*. Temperatur der Respirationskammer 8° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 37,8° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	1,060	0,85	0,567	0,785	0,723
8 30′— 9	1,020	0,80	0,546	0,739	0,739
9 — 9 30	1,310	0,92	0,701	0,850	0,806
9 30 —10	1,200	0,92	0,642	0,850	0,756
10 —10 30	1,140	0,85	0,610	0,785	0,777
10 30 —11	1,180	0,82	0,632	0,757	0,834
11 —11 30	1,330	0,97	0,712	0,896	0,795
11 30 —12	1,290	0,96	0,691	0,886	0,779

Tabelle XXIII.

Versuch vom 7. Oktober 1924. Kaninchen Nr. 44, Geschlecht ♂, Gewicht 1650 g. 24 Stunden gehungert. Laboratoriumstemperatur 18° C. Barometerstand 739. 9 Uhr 30 Minuten wurden 2 ccm *Äthylenglykol* in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 38,2° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	0,660	0,46	0,407	0,496	0,820
8 30′— 9	0,590	0,46	0,364	0,496	0,733
9 — 9 30	0,610	0,45	0,376	0,485	0,775
9 30 —10	—	—	—	—	—
10 —10 30	1,690	1,16	0,521	0,625	0,832
10 30 —11	0,770	0,53	0,475	0,572	0,830
11 —11 30	0,740	0,52	0,456	0,561	0,813
11 30 —12	0,750	0,50	0,462	0,539	0,857
12 —12 30	0,700	0,51	0,431	0,550	0,784
12 30 —13	0,800	0,53	0,493	0,572	0,862

Tabelle XXIV.

Versuch vom 15. Oktober 1924. Kaninchen Nr. 44, Geschlecht ♂, Gewicht 1650 g. Nicht gehungert. Vor dem Versuche wurden 15 g *Glucose* per os einverleibt. Laboratoriumstemperatur 18° C. Barometerstand 744. 9 Uhr 30 Minuten wurden 5 ccm *Äthylenglykol* mit 25 ccm Wasser in den Magen eingeflößt. Temperatur der Respirationskammer 29° C. Körpertemperatur des Tieres nach dem Versuche 38,2° C.

Zeit	CO_2 g	O_2 Liter	CO_2 in Liter pro kg u. Stunde	O_2 in Liter pro kg u. Stunde	$\frac{CO_2}{O_2}$
8h — 8h 30′	1,000	0,48	0,617	0,521	1,183
8 30′— 9	1,060	0,52	0,654	0,565	1,157
9 — 9 30	1,020	0,55	0,629	0,597	1,053
9 30—10	1,120	0,65	0,691	0,706	0,978
10 —10 30	1,150	0,60	0,709	0,652	1,088
10 30—11	0,990	0,60	0,610	0,652	0,936
11 —11 30	0,990	0,56	0,610	0,608	1,003
11 30—12	0,910	0,56	0,561	0,608	0,922
12 —12 30	0,940	0,51	0,580	0,554	1,022

$$C_2H_6O_2 + 5\,O = 2\,CO_2 + 3\,H_2O,$$
Respirationsquotient = 0,80.

Der Glucoseversuch hat die größte Bedeutung, da er zeigt, daß das Äthylenglykol nicht wie der Äthylalkohol den Respirationsquotienten verringert, daß es also keine kohlenhydratsparende Wirkung hat. Dagegen ist seine spezifisch-dynamische Wirkung sowohl bei intravenöser als auch bei oraler Verabreichung stark.

Um zusammenfassend unsere Ergebnisse zu besprechen, müssen wir notwendig zu theoretischen Überlegungen Zuflucht nehmen. Die Gesamtheit von Stoffen, die durch den Abbau der komplizierten Moleküle der Nahrungsstoffe entstehen, bis zu CO_2 und H_2O, bezeichnen wir als Intermediärprodukte. Es ist natürlich, daß sich unter diesen Stoffe von sehr differenten Eigenschaften finden müssen. Vielleicht gelingt es uns, sie in zwei große Gruppen einzuteilen. Die erste, die Gruppe der Übergangsstoffe, in unserer Versuchsreihe repräsentiert durch die Milchsäure, die Brenztraubensäure und möglicherweise auch die Bernsteinsäure, stellen ein Übergangsstadium der einzelnen Nahrungsstoffe dar, haben eine geringe Affinität zum Sauerstoff, so daß sie nicht ohne weiteres dem oxydativen Abbau anheimfallen. Dagegen kommt ihnen im hohen Maße die Fähigkeit zu, sich zu Molekülen von komplizierterem Bau zu synthetisieren. Ohne erschwerte physiologische Oxydabilität wäre ihre Bedeutung als Übergangsstoffe schwer begreiflich, denn nur diese kann sie vor dem oxydativen Zerfall schützen. Auf der anderen Seite würden dann Stoffe von bedeutender Oxydabilität stehen, die sofort, wenn sie in den Geweben auftreten, dem Zerfall verfallen sind.

So können wir z. B. das Dioxyaceton als Stoff auffassen, der eine Stufe des oxydativen Zerfalls der Kohlenhydrate darstellt und als solche sofort weiter oxydiert wird. Doch kann es ebensogut zur Synthese von Glucose verwendet werden, um sich als solche an dem Stoffwechsel zu beteiligen. Sich ein Urteil über die Bernsteinsäure zu bilden, ist bis jetzt nicht möglich, auf keinen Fall gehört sie aber den Stoffen der Oxydationsgruppe an, sondern stellt höchstens ein Übergangsprodukt dar. Wir haben also im Gasstoffwechsel ein wertvolles Mittel zur Trennung der Intermediärstoffe in zwei große Gruppen.

Wenn die von uns erzielten Ergebnisse in mancher Richtung noch nicht eindeutig sind, so wird unsere Methodik doch geeignet sein, im Verein mit anderen Versuchsanordnungen auf so manche Frage des Stoffwechsels ein klärendes Licht zu werfen. Wir sind überzeugt, daß der Gasstoffwechsel, trotzdem er in den Monographien über den intermediären Stoffwechsel von *Dakin*, *Woringer* und *Neubauer* als Untersuchungsmethode nicht die nötige Berücksichtigung findet, trotzdem er auch sonst nirgends in der Literatur eine systematische, den Problemen des intermediären Stoffwechsels angepaßte Durcharbeitung erfahren hat, verdient, als Untersuchungsmethode gerade für diese Fragen mit herangezogen zu werden. Denn ein unschätzbarer Vorzug dieser Methode besteht darin, daß bei ihr das intakte Tier als Versuchsobjekt dient. Ferner erlaubt sie gewisse Schlüsse auf die quantitativen Verhältnisse bei der Verbrennung einzelner Abbauprodukte und dadurch indirekt auf den Grad ihrer Verwertbarkeit durch den Stoffwechsel.

Zusammenfassung.

Es wird versucht, den Gasstoffwechsel des Kaninchens zum Studium des intermediären Stoffwechsels heranzuziehen. Diese Methode verspricht, wichtige Resultate zu liefern.

1. Der kohlenhydratsparende Einfluß des Alkohols wird bestätigt. Es wird bewiesen, daß dieser durch niedrige Außentemperaturen nicht erhöht wird.

2. Das Dioxyaceton ist den Kohlenhydraten im Respirationsversuch gleichwertig, was durch die langdauernde Erhöhung des Respirationsquotienten durch diesen Stoff und durch den Grad seiner spezifisch-dynamischen Wirkung bewiesen wird.

3. Bernsteinsäure wird im Körper nicht vollkommen bis zu den Endprodukten Kohlensäure und Wasser verbraucht. Ihre spezifisch-dynamische Wirkung ist groß.

4. Brenztraubensäure wird nur zum kleinen Teile während einer kurzen Zeit zu CO_2 und H_2O verbrannt.

5. Die Ergebnisse mit Äthylenglykol und inaktiver Milchsäure beweisen, daß eine Verbrennung dieser Stoffe zu Kohlensäure und

Wasser nicht stattfindet. Die Untersuchungen über das Glycerin lassen Schlüsse nicht zu.

6. Alle diese Stoffe haben einen verschiedenen Grad von spezifisch-dynamischer Wirkung.

Aus diesen Versuchen können wir folgende Schlüsse ziehen: Äthylalkohol und Dioxyaceton sind vollkommen verbrennbare Körper, die der Organismus vor anderen Nahrungsstoffen bevorzugt. Dagegen wird die Brenztraubensäure, die Bernsteinsäure und die Milchsäure im Körper nicht vollständig verbrannt, sondern zu anderen Stoffen synthetisch weiterverarbeitet.

Literatur.

Dakin, Oxydations and reductions in animal body. London 1922. — *Woringer*, La dégradation des acides gras dans l'organisme animal. Paris. — *R. Rosenmann*, Handb. d. Biochem., II. Aufl., 8, 482. (Literatur über Alkohol.) — *Isaac*, Klin. Wochenschr. 1924, Nr. 27.

Über die Wirkung von Photokatalysatoren auf das Frühtreiben ruhender Knospen und auf die Samenkeimung.

Von

Anneliese Niethammer (Prag).

(Aus dem Laboratorium für Pflanzenernährung der landwirtschaftlichen Abteilung der Prager Deutschen Technischen Hochschule in Tetschen-Liebwerd.)

(Eingegangen am 6. März 1925.)

Mit 3 Abbildungen im Text.

In der Wirkung des Sonnenlichtes als energetischer Nahrung ist der gesamte Stoffwechsel der grünen Pflanzen verankert. Bei dieser fundamentalen Bedeutung der Lichtenergie für die Ernährung, das Wachstum, den Ertrag und die Zusammensetzung, angesichts der offenkundigen Wirkungen, die das Licht auf die Gestaltung der Organe und des gesamten Habitus der Pflanzen und im Zustandekommen mannigfacher Reizbewegungen derselben ausübt, ist es eine der vornehmsten Aufgaben der Pflanzenphysiologie, dem Mechanismus, der all diesen Lichtwirkungen zugrunde liegt, nachzuspüren. Nichts liegt näher als die Annahme, daß ebenso wie die von vielen Seiten und unter verschiedenen Gesichtspunkten studierte Photosynthese der grünen Pflanze, auch alle sonstigen Lichteinflüsse auf die Pflanze letzten Endes auf photochemischen Reaktionen beruhen.

Unter diesen verdienen vor allen die lichtkatalytischen Prozesse besondere Beachtung, weil sowohl fluoreszierende Farbstoffe als auch gewisse Metalle, insbesondere das Eisen, bei ihrer fast allgegenwärtigen Verbreitung in den Pflanzen sehr wohl als Photokatalysatoren im pflanzlichen Stoffwechsel sich betätigen können. Wenn eine schon an und für sich am Organismus auftretende Lichtreaktion durch Einführung eines Photokatalysators in ihrer Geschwindigkeit beschleunigt wird, dann besteht die Wahrscheinlichkeit dafür, daß diese Lichtwirkung auch in der unbehandelten Pflanze entweder als solche oder in einem Teilprozeß lichtkatalytischer Natur ist, denn es ist nicht

einzusehen, warum die erwähnten nativ in den Pflanzen vorkommenden Stoffe, deren Fähigkeit, als Photokatalysatoren zu wirken, in vitro sichergestellt ist, diese Funktion nicht auch in der Pflanze entfalten sollten. So schließt *P. Metzner*[1]) für die durch photodynamisch wirksame Farbstoffe induzierte Phototaxis von Paramaecien aus der Verschiebung ihrer Absorptions- und Fluoreszenzspektra auf „Innenwirkung" dieser Farbstoffe und erblickt darin eine Stütze für seine Ansicht, „daß die induzierten Reizbewegungen (Phototaxis und Phototropismus) den normalen photobiologischen Reaktionen analog verlaufen". Wenn umgekehrt Lichtwirkungen am Organismus durch Einverleibung von Photokatalysatoren keine Beschleunigung oder Verstärkung erfahren, dann könnte dies ein Hinweis sein, daß diese Reaktionen anderer Natur sind.

Von diesen Gesichtspunkten aus werden in vorliegender Arbeit zwei Erscheinungen des pflanzlichen Wachstums, das Austreiben ruhender Winterknospen und die Samenkeimung, daraufhin untersucht, ob sich diese Wachstumsvorgänge photokatalytisch beeinflussen lassen. Für beide Prozesse ist eine gewisse Lichtempfindlichkeit bekannt.

Die ersten Mitteilungen über den Einfluß des Lichtes auf das Austreiben von Knospen, und zwar der Rotbuche, stammen von *Jost*[2]). Lichtausschluß verhindert das Austreiben der Buchensknospen; wie Versuche im CO_2-armen Raum am Lichte zeigen, kann dafür nicht die im Dunkeln unterdrückte Kohlensäureassimilation verantwortlich gemacht werden. Diese Lichtwirkung wäre daher an andere durch das Licht in der Pflanze hervorgerufene stoffliche Umsetzungen gebunden zu denken. Von *Wiesner*[3]) liegen allgemeine Untersuchungen über die Bedeutung des Sonnen- und diffusen Tageslichts auf die Laubentwicklung sommergrüner Gewächse vor. Gelegentlich machte auch *Molisch*[4]) Beobachtungen über einen günstigen Lichteinfluß auf das Treiben von Syringa und Prunusarten im Februar. *Wisniewski*[5]) teilt mit, daß die Ruheperiode bei Hydrocharis Morsus ranae durch Verdunklung um 6 Monate verlängert wird und die Keimung der Winterknospen von Utricularia vulgaris vom Lichte abhängig ist.

Wohl den interessantesten Fall der Lichtwirkung auf ruhende Knospen stellt aber das Treiben der Buche in kontinuierlicher elektrischer Beleuchtung dar. *Klebs*[6]) gelang es, zu jeder Zeit des Winters Buchenknospen, die bis dahin durch kein anderes Mittel getrieben werden konnten, dadurch zur Entfaltung zu bringen, daß er die Buchen in einen elektrischen Lichtraum einstellte. *Klebs* erblickte in diesem Verhalten der Buche zum Licht etwas durchaus Eigenartiges: „Die Buche ist bisher das einzige Beispiel, bei dem

---

[1]) *P. Metzner*, diese Zeitschr. **148**, 498, 1924.

[2]) *Jost*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **12**, 189, 1894.

[3]) *Wiesner*, Sitzber. d. Wien. Akad. **120**, 1904.

[4]) *Molisch*, ebendaselbst **117**, 87, 1908; I., **118**, 637, 1909.

[5]) *Wisniewski*, Bull. de l'acad. de Cracovie 1912; zitiert bei *Lehmann* und *Ottenwälder*, Zeitschr. f. Bot. **5**, 361, 1913.

[6]) *Klebs*, Heidelberger Akad. d. Wiss., math.-naturw. Klasse, 1914, 3. Abt.

das Licht so wesentlich beim Austreiben der Knospen mitwirkt, es scheint allerdings auch in einem gewissen Grade für Carpinus notwendig zu sein, doch fehlen noch genauere Bestimmungen." *Klebs* findet es unwahrscheinlich, daß das Lichttreiben der Buche auf einer photokatalytischen Reaktion beruhe, denn im CO_2-freien bzw. -armen Raum unterbleibe im Gegensatz zu den Beobachtungen *Josts* das Austreiben der Buchenknospen und abgesehen davon seien zum Unterschiede von dem Verhalten lichtempfindlicher Samen ziemlich große Lichtmengen für das Austreiben der Knospen nötig. *Klebs* vermutet vielmehr Beziehungen des Lichttreibens zur C-Assimilation der Buchenknospen. Die Bedeutung der C-Assimilation soll nach seiner Meinung nicht in der Vermehrung der ohnehin reichlich in den Knospen vorhandenen Kohlenhydrate, sondern in der Bildung primärer reaktionsfähiger Assimilationsprodukte liegen (Aldehyde). — Daß das Licht nicht das einzige Mittel ist, um die Winterruhe der Buchenknospen wirksam abzukürzen, zeigte *Weber*[1]), der Buchenknospen, ungeachtet der geringeren Lichtintensität im Winter, mit Hilfe der Acetylenmethode zum frühen Austreiben brachte. — *Kühn*[2]) erwähnt, daß häufig bei Treibversuchen das Licht insofern einen günstigen Einfluß ausübt, als viele Pflanzen an der dem Lichte zugekehrten Seite zuerst austreiben. *Höstermann*[3]) berichtet, daß im elektrischen Lichtraum das Frühtreiben gewisser Mandel- und Schneeballarten begünstigt wird. Nach Angaben von *Ringel-Suessenguth*[4]) fördert das Licht das Austreiben der Überwinterungsorgane von Myriophyllum verticillatum, Utricularia vulgaris und verschiedenen Lebermoosen; durch Lichtmangel läßt sich im Sommer eine vorzeitige Bildung der Ruheorgane erzielen.

Daß die frühtreibende Wirkung des Lichtes (elektrischer Lichtraum) auf ruhende Winterknospen bei unseren Holzgewächsen verbreiteter anzutreffen ist als nach den bisherigen Angaben erwartet werden konnte, lassen die hier mitgeteilten Versuche erkennen. Untersuchungen über die Einwirkung von Lichtkatalysatoren auf das Austreiben ruhender Knospen sind bisher nicht angestellt worden. Vielleicht aber gehört nach unseren Erfahrungen die von *Popoff*[5]) mitgeteilte Beobachtung hierher, daß Einspritzungen von Mangansalzen (unter vielen anderen Stoffen) ruhende Knospen in ihrer Entwicklung beschleunigen. —

Daß die Keimung von Samen durch Licht beeinflußt wird, ist bekannt. Früher glaubte man an eine mehr oder weniger weitgehende Unabhängigkeit der Samenkeimung vom Licht; zu Beginn unseres Jahrhunderts mehrten sich allerdings die Angaben, die von einem günstigen Einfluß des Lichtes auf die Keimung gewisser Samen berichten, und heute ist über das Problem der Lichtkeimung eine ziemlich große Literatur vorhanden.

Lehmann und *Ottenwälder*[6]) neigen dazu, daß die Lichtkeimung auf einer katalytischen Lichtwirkung beruhe, worin *Ottenwälder* besonders

---

[1]) *Weber*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **34**, 7, 1916.
[2]) *Kühn*, Jahrb. f. wiss. Bot. **57**, 1, 1917.
[3]) *Höstermann*, Zeitschr. d. Ver. deutsch. Ing. **66**, 523, 1922.
[4]) *Ringel-Suessenguth*, Flora **115**, 27, 1922.
[5]) *Popoff*, Biol. Centralbl. **36**, 1916; **43**, 244, 1923.
[6]) Zeitschr. f. Bot. **1**, 122, 1909; **4**, 466, 1912; **11**, 161, 1919; Ber. d. deutsch. bot. Ges. **27**, 476, 1909; **29**, 577, 1911; diese Zeitschr. **50**, 388, 1913; Zeitschr. f. Bot. **6**, 785, 1914; **5**, 337, 1913.

durch seine Versuche über die Wirkung von Säuren auf die Keimung solcher Samen bestärkt wird. Die Lichtenergie werde zur Erhöhung der Geschwindigkeit einer Reaktion (katalytische Lichtreaktion) verbraucht, wie auch höhere Temperatur auf die Keimung im Dunkeln reaktionsbeschleunigend wirkt. *Hesse*[1]) hält allerdings diese Erklärung für unwahrscheinlich, da es seiner Meinung nach bei der Anwendung von Säuren sehr häufig zu einer falschen Keimung kommt, d. h. der Keimling wird zur Samenschale herausgedrückt, aber er ist schwer geschädigt und nicht mehr entwicklungsfähig. Doch schließt er die katalytische Natur der Lichtwirkung nicht aus, sondern verlegt nur ihren Sitz in die äußeren Samenschichten.

Es fehlte auch nicht an Versuchen, in denen die Samenkeimung in ihrer Beeinflussung durch Lichtkatalysatoren untersucht wurde. *Simon*[2]) tränkte Samen von Kresse, Salat, Hafer und Radieschen mit 1 Proz. Ferri-, Ferro- und Uranylsulfat, exponierte sie nach dem Trocknen dem Sonnenlichte während mehrerer Monate und ließ sie dann in Gartenerde am Lichte auskeimen. Die Ergebnisse waren nicht gleichsinnig. Belichtung der nicht vorbehandelten Samen hemmte deutlich oder förderte schwach ihre Keimkraft, ähnlich die bloße Vorbehandlung mit den genannten Salzen ohne nachfolgende Belichtung. Die Kombination der Belichtung mit der Eisen- bzw. Uranwirkung führte jedoch in einzelnen Fällen zu einer bedeutenden Hebung der Keimprozente, die in anderen Fällen wieder ausblieb oder sogar eine schwache Erniedrigung der Keimprozente nach sich zog. An Samen von Leguminosen, Rübe, weißem Senf und Weizenkörnern hat *Piskernik*[3]) die schädigenden Wirkungen photodynamisch wirksamer Farbstoffe auf die Keimung und das Keimlingswachstum studiert. Nur die noch wirksamen Grenzkonzentrationen der verwendeten Farbstoffe 1 : 50000 bis 1 : 100000 bedingten manchmal eine kleine Beschleunigung des Wachstums von Würzelchen und Hypokotyl, worin aber *Piskernik* nicht eine Lichtkatalyse, sondern die anregende Wirkung kleiner Giftdosen erblickt. Endlich berichtet *Popoff* (l. c.), den Ertrag von Gerste, Senf, Mais und Weizen durch 12stündiges Baden der Körner in Mangansalzlösungen (1- und 4 prom.) gesteigert zu haben, was er aber gleichfalls nicht im Sinne einer Lichtkatalyse deutet.

Der Einfluß photokatalytisch wirksamer Stoffe auf ausgesprochene Lichtkeimer, also auf Samen, die an und für sich schon lichtempfindlich sind, scheint noch nicht untersucht worden zu sein, worüber daher im zweiten Teil der Arbeit berichtet werden soll.

1. Teil:

Zur Photokatalyse des Frühtreibens.

Methodik.

Es wurde durchweg mit abgeschnittenen Zweigen unserer Holzgewächse gearbeitet, weil der Versuchsraum nur ein beschränktes Fassungsvermögen hatte. Der Nachteil dieser Methode besteht darin, daß die Knospen bei weitem nicht so vollzählig und gleichmäßig austreiben wie

---

[1]) *Hesse*, Ber. d. deutsch. bot. Ges. **41**, 316, 1923; ferner *Gardner*, Bot. Gaz. **71**, 249, 1921.

[2]) *Simon*, diese Zeitschr. **48**, 410, 1913.

[3]) *Piskernik*, Sitzber. d. Wien. Akad. I., **130**, 1921.

an eingetopften Pflanzen. Es wurde dabei auch die von *Klebs* (l. c.) mitgeteilte Beobachtung gemacht, daß die an den Enden der Zweige sitzenden Knospen sich leichter entfalten als die tiefer inferierten. Der gleichen Vorbehandlung wurden stets drei zu einem Bündel zusammengefügte Zweige unterworfen. Die Zweiglänge betrug 30 bis 60 cm.

Von vornherein erschien das Einbringen der Photokatalysatoren in die Knospen schwierig. Anfänglich wurden die Lösungen derselben mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe in die Zweige eingesogen. Dann wurde dieses ziemlich umständliche Verfahren ersetzt durch Injizierung der Lösungen in die Knospe mittels einer *Pravaz*schen Spritze. Zur Kontrolle diente in diesem Falle das Einspritzen destillierten Wassers in die Knospen. Schließlich zeigte aber der Erfolg, daß es oft schon genügte, die Zweige mit ihren Spitzen nach unten durch 6 Stunden in den Lösungen zu baden. Das Baden wurde im ungeheizten Zimmer in entsprechend hohen Glaszylindern bei Lichtabschluß vorgenommen. Zum Vergleich diente wiederum ein gleich langes Bad in destilliertem Wasser. Bei den meisten Badeversuchen wurden zur Erleichterung des Eindringens der Lösungen und des Lichtes die Knospenschuppen entfernt, was natürlich auch bei den Kontrollzweigen in destilliertem Wasser bzw. in der Dunkelheit geschah. Wo im folgenden nicht ausdrücklich die Belassung der Knospenschuppen erwähnt wird, handelt es sich um entschuppte Knospen.

Als Photokatalysatoren dienten die üblichen fluoreszierenden Farbstoffe, wie Eosin und Erythrosin, in Verdünnungen 1 : 1000 bis 1 : 50000, Methylenblau in solchen von 1 : 5000 bis 1 : 100000. Die photokatalytisch wirksamen Salze des Eisens und das Uranylsalz gelangten in Konzentrationen 0,25-, 0,5- und 1 proz. zur Anwendung.

Anfänglich gelangten die zum Treiben am Licht bestimmten Versuchszweige, die nach der Vorbehandlung in Gläser mit gewöhnlichem Wasser eingestellt wurden, in einem Warmhaus unter geeigneten Wachstumsbedingungen zur Aufstellung. Wegen der ungünstigen Belichtungsverhältnisse daselbst wurde dann ausschließlich künstliches Licht in Anlehnung an die Versuchsanordnung von *Klebs* (l. c.) zur Beleuchtung der Zweige verwendet. Als Treibraum dienten zwei mit Zinkblech ausgeschlagene Kisten (1,20 × 1 m, Höhe 1,80 m). Der Boden der Kisten war mit Sand bedeckt, der durch täglich dreimaliges Spritzen feucht erhalten wurde. Der Kistendeckel, der lose aufsaß, hatte in der Mitte einen kreisförmigen Ausschnitt, in den eine elektrische Glühlampe (Nitra) von 300 HK bis zur Hälfte eingeführt wurde. *Klebs*, der in einem ähnlichen Lichtraum seine Treibversuche ausgeführt hat, gibt an, daß für das Austreiben der Knospen das Produkt aus Lichtintensität × Beleuchtungsdauer maßgebend sei. In der Umgebung der Knospen betrug die Temperatur nach den Angaben eines Maximum-Minimum-Thermometers 20 bis 22° C. Die Feuchtigkeit in den Kisten schwankte nach den Ablesungen eines Psychrometers zwischen 70 und 100 Proz., entsprechend einem Mittel von 85 Proz.

Vergleichsversuche wurden unter Lichtabschluß gehalten. Diese Gläser standen in derselben Kiste, waren aber von einem 1 m hohen Dunkelsturz aus Zinkblech bedeckt, die Temperatur bewegte sich hier zwischen 21 und 24° C.

Die Untersuchungen wurden von Anfang November 1922 bis März 1923 ausgeführt.

Versuche.

Die folgende Tabelle I enthält eine Zusammenstellung der Ergebnisse sämtlicher Versuche im elektrischen Lichtraum. Zum Vergleich der Wirkung der verschiedenen Vorbehandlung wurde in dieser Tabelle die Zeit in Tagen (vierte Kolumne) aufgenommen, nach welcher das erste deutlich wahrnehmbare Knospenwachstum beobachtet wurde. Die fünfte Kolumne enthält dann den sich so ergebenden Vorsprung in Tagen, um welchen die mit Photokatalysatoren behandelten Knospen früher zu treiben beginnen, als die mit destilliertem Wasser behandelten Kontrollen.

An die Tabelle I schließt sich die ausführlichere Darstellung einiger Versuche, aus welchen der Verlauf des Knospenwachstums während der ganzen Versuchsdauer ersichtlich ist. Hier befinden sich auch die Bemerkungen über das Verhalten der im Dunkeln gehaltenen Parallelversuche, in welchen die Vorbehandlung der Knospen sonst die gleiche war wie in den Lichtversuchen. Parallelversuche bei Lichtabschluß wurden außerdem noch zu den Versuchen (s. Tabelle I) mit Aesculus Hippocastanum (6. Dezember) und Betula verrucosa (17. Januar) ausgeführt, ferner Corylus avellana (s. S. 291) und Alnus glutinosa (20. Januar, Eosin 1 : 10000 und Methylenblau 1 : 20000 licht und dunkel, aber ohne Vergleichsversuch mit destilliertem Wasser), alle mit dem Ergebnis, daß während der Versuchsdauer in den Dunkelversuchen ein Austreiben der Knospen nicht erfolgte.

Tabelle I.

Pflanze	Versuchsbeginn	Vorbehandlung		Austreiben nach Tagen	Vorsprung in Tagen
Syringa vulgaris	26. XI.	Injektionen mit			
		Eosin	1 : 5 000	3	2
			1 : 10 000	3	2
		Erythrosin	1 : 5 000	3	2
			1 : 10 000	3	2
		Dest. Wasser		5	—
	29. XI.	Injektionen mit			
		Eosin	1 : 5 000	3	2
			1 : 10 000	3	2
		Erythrosin	1 : 5 000	3	2
			1 : 10 000	3	2
		Dest. Wasser		5	—
	1. XII.	Bad in			
		Eosin	1 : 10 000	3	2
			1 : 20 000	3	2
		Erythrosin	1 : 10 000	3	2
			1 : 20 000	3	2
		Dest. Wasser		5	—

Tabelle I (Fortsetzung).

Pflanze	Versuchs-beginn	Vorbehandlung		Austreiben nach Tagen	Vorsprung in Tagen
Syringa vulgaris	2. XII.	Injektionen mit			
		Uranylsulfat	1 Proz.	3	2
			0,5 „	3	2
		Ferrisulfat	1 „	3	2
			0,5 „	3	2
		Ferrosulfat	1 „	4	1
			0,5 „	4	1
		Dest. Wasser		5	—
	10. XII.	Bad in			
		Eosin	1 : 10 000	3	2
		Dest. Wasser		5	—
Prunus avium	3. XII.	Injektionen mit			
		Eosin	1 : 5 000	5	4
			1 : 10 000	6	3
		Dest. Wasser		9	—
Sambucus nigra	3. XII.	Bad in			
		Eosin	1 : 10 000	5	5
			1 : 20 000	5	5
		Erythrosin	1 : 10 000	2	8
		Methylenblau	1 : 20 000	6	4
			1 : 50 000	6	4
		Dest. Wasser		10	—
Aesculus Hippocastanum	6. XII.	Injektionen mit			
		Eosin	1 : 5 000	8	2
		Erythrosin	1 : 5 000	8	2
		Methylenblau	1 : 10 000	9	1
		Dest. Wasser		10	—
Betula verrucosa	3. XI.	Bad in			
		Eosin	1 : 10 000	8	5
		Erythrosin	1 : 10 000	8	4
		Methylenblau	1 : 20 000	9	5
		Dest. Wasser		13	—
	5. I.	Bad in			
		Eosin	1 : 10 000	6	3
		Erythrosin	1 : 10 000	5	4
		Methylenblau	1 : 20 000	7	2
		Dest. Wasser		9	—
	17. I.	Bad in			
		Eosin	1 : 10 000	4	3
		Erythrosin	1 : 10 000	5	2
		Methylenblau	1 : 20 000	6	1
		Dest. Wasser		7	—
Quercus pedunculata	5. I.	Bad in			
		Eosin	1 : 10 000	9	4
		Erythrosin	1 : 10 000	9	4
		Dest. Wasser		13	—
	11. I.	Bad in			
		Uranylsulfat	0,5 Proz.	5	2
		Ferrisulfat	0,5 „	5	2
		Dest. Wasser		7	—

Tabelle I (Fortsetzung).

Pflanze	Versuchsbeginn	Vorbehandlung		Austreiben nach Tagen	Vorsprung in Tagen
Quercus pedunculata	21. I.	Bad in			
		Erythrosin	1 : 10 000	4	4
		Dest. Wasser		8	—
Tilia parvifolia	21. XI.	Injektionen mit			
		Eosin	1 : 5 000	13	7
			1 : 10 000	12	8
			1 : 20 000	12	8
		Erythrosin	1 : 5 000	17	3
			1 : 10 000	13	7
		Methylenblau	1 : 10 000	10	10
			1 : 20 000	10	10
		Dest. Wasser		20	—
	3. XII.	Injektionen mit			
		Eosin	1 : 5 000	4	3
			1 : 10 000	4	3
		Erythrosin	1 : 5 000	5	2
		Methylenblau	1 : 10 000	5	2
		Dest. Wasser		7	—
	3. I.	Bad in			
		Eosin	1 : 10 000	7	4
			1 : 20 000	7	4
		Erythrosin	1 : 10 000	9	2
		Methylenblau	1 : 20 000	9	2
		Dest. Wasser		11	—
	3. I.	Injektionen mit			
		Uranylsulfat	0,5 Proz.	13	4
		Ferrisulfat	0,5 „	14	3
		Ferrosulfat	0,5 „	14	3
		Dest. Wasser		17	—
	3. XII.	Injektionen mit			
		Ferrisulfat	0,5 Proz.	14	3
		Ferrosulfat	0,5 „	14	3
		Dest. Wasser		17	—
Fagus silvatica	21. XI.	Injektionen mit			
		Eosin	1 : 5 000	19	4
			1 : 10 000	16	3
		Erythrosin	1 : 5 000	21	2
			1 : 10 000	20	3
			1 : 20 000	20	3
		Methylenblau	1 : 10 000	19	4
			1 : 20 000	22	1
		Dest. Wasser		23	—
	10. I.	Injektionen mit			
		Eosin	1 : 5 000	9	5
			1 : 10 000	9	5
		Erythrosin	1 : 5 000	11	3
			1 : 10 000	11	3
		Methylenblau	1 : 10 000	10	4
		Dest. Wasser		14	—

Tabelle I (Fortsetzung).

Pflanze	Versuchsbeginn	Vorbehandlung		Austreiben nach Tagen	Vorsprung in Tagen
Fagus silvatica	7. I.	Bad in			
		Eosin	1 : 10 000	8	6
		Erythrosin	1 : 10 000	6	8
		Methylenblau	1 : 20 000	6	8
		Dest. Wasser		14	—
	6. II.	Injektionen mit			
		Eosin	1 : 5 000	6	2
		Dest. Wasser		8	—
		Erythrosin	1 : 10 000	6	2
	21. XI.	Injektionen mit			
		Uranylsulfat	0,5 Proz.	24	3
		Ferrisulfat	0,5 „	24	3
		Dest. Wasser		27	—
	7. I.	Injektionen mit			
		Uranylsulfat	1 Proz.	17	1
		Dest. Wasser		18	—
	17. I.	Injektionen mit			
		Ferrisulfat	0,5 Proz.	9	5
		Ferrosulfat	0,5 „	10	4
		Dest. Wasser		14	—
Acer platanoides	1. II.	Bad in			
		Eosin	1 : 10 000	9	7
		Dest. Wasser		16	—
	2. II.	Bad in			
		Erythrosin	1 : 10 000	8	8
		Dest. Wasser		16	—
	30. I.	Bad in			
		Methylenblau	1 : 20 000	12	7
		Dest. Wasser		19	—
Alnus glutinosa	4. I.	Injektionen mit			
		Eosin	1 : 5 000	13	7
			1 : 10 000	13	7
		Erythrosin	1 : 5 000	13	7
			1 : 10 000	13	7
		Methylenblau	1 : 10 000	15	5
		Uranylsulfat	1 Proz.	13	7
		Ferrisulfat	1 „	15	5
		Ferrosulfat	1 „	14	6
		Dest. Wasser		20	—
Robina pseudacacia	17. I.	Bad in			
		Eosin	1 : 10 000	6	1
		Dest. Wasser		7	—
	22. I.	Bad in			
		Eosin	1 : 10 000	4	1
		Dest. Wasser		5	—

Syringa vulgaris.

1. Versuch.

Aufgestellt am 26. November 1922.

Tag	Injektionen der Knospen mit				
	Wasser	Eosin			
		1 : 1000	1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000
29. XI.	—	—	beginnt		—
30. XI.	—	—	treibt		—
1. XII.	treibt	—	„		—
2. XII.	„	—	„		—
3. XII.	„	—	Schuppen lösen sich		treibt
4. XII.	„	beginnt	„ „ „		„
5. XII.	„	treibt	beginnt sich zu entfalten		„
6. XII.	Schuppen lösen sich	geschädigt	„ „ „ „		wie Wasser
7. XII.	ebenso	„	ganz kleine Blättchen		—
8. XII.	entfaltet sich	„	Blättchen		—
9. XII.	„ „	abgestorben	„		–
10. XII.	kl. Blättchen	—	Blätter		—

Ein gleicher Versuch, der unter Lichtabschluß gehalten wurde, zeigte in der Versuchszeit keine Entwicklung.

2. Versuch.

Aufgestellt am 26. November 1922.

Tag	Injektionen der Knospen mit				
	Wasser	Erythrosin			
		1 : 1000	1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000
29. XI.	—	—	beginnt		—
30. XI.	—	—	treibt		—
1. XII.	treibt	—	„		treibt
2. XII.	„	—	„		„
3. XII.	„	beginnt	„		wie Wasser
4. XII.	„	treibt	Schuppen lösen sich		„
5. XII.	„	geschädigt	beginnt sich zu entfalten		„
6. XII.	Schuppen lösen sich	„	entfaltet sich		„
7. XII.	ebenso	„	Blättchen		„
8. XII.	entfaltet sich	„	„		„
9. XII.	kl. Blättchen	—	Blätter		„

Ein entsprechender Dunkelversuch zeigte in der angegebenen Zeit keine Entwicklung.

3. Versuch. Aufgestellt am 1. Dezember 1922.

Tag	Entschuppte Knospen 6 Stunden gebadet in				
	Wasser	Eosin			
		1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 50 000
4. XII.	—	—	treibt		—
5. XII.	—	—	„		—
6. XII.	beginnt	—	Beginn der Entfaltung		—
7. XII.	treibt	treibt	„ „ „		treibt
8. XII.	„	„	Entfaltung		„
9. XII.	„	„	Blättchen		wie in Wasser
10. XII.	Beginn der	„	„		„
11. XII.	Entfaltung	geschädigt	„		„

Ein paralleler Versuch im Dunkeln zeigte in gleicher Zeit keine Entwicklung.

4. Versuch. Aufgestellt am 2. Dezember 1922.

Tag	Injektionen der Knospen mit			
	Wasser	Uranylsulfat 1 und 0,5 Proz.	Ferrisulfat 1 und 0,5 Proz.	Ferrosulfat 1 und 0,5 Proz.
5. XII.	—	beginnt	beginnt	—
6. XII.	—	treibt	treibt	beginnt
7. XII.	beginnt	„	„	treibt
8. XII.	treibt	„	„	„
9. XII.	„	Schuppen lösen sich	„	„
10. XII.	„	„ „ „	Schuppen lösen sich	Schuppen lösen sich
11. XII.	„	Entfaltung	Entfaltung	Entfaltung
12. XII.	Schuppen lösen sich	kl. Blättchen	kl. Blättchen	kl. Blättchen
13. XII.	„ „ „	Blättchen	Blättchen	Blättchen

Ein paralleler Dunkelversuch zeigte in der gleichen Zeit keine Entwicklung.

Tilia parvifolia.

5. Versuch. Aufgestellt am 21. November 1922.

Tag	Injektionen der Knospen mit				
	Wasser	Eosin			
		1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 50 000
3. XII.	—	—	Schuppen werden leicht		—
4. XII.	—	treibt	gehoben		—
5. XII.	—	„	ebenso		—
6. XII.	—	„	„		—
7. XII.	—	Schuppen	Beginn der Entfaltung		—
8. XII.	—	lösen sich	„ „ „		—
9. XII.	—	ebenso	„ „ „		—
10. XII.	—	Entfaltung	Entfaltung		—
11. XII.	treibt	„	„		treibt
12. XII.	„	Blättchen	Blättchen		„

Ein paralleler Dunkelversuch zeigte in gleicher Zeit keine Entwicklung.

6. Versuch. Aufgestellt am 21. November 1922.

Tag	Injektionen der Knospen mit			
	Wasser	Erythrosin		
		1 : 1000	1 : 5000	1 : 10 000
4. XII.	—	—	—	beginnt
5. XII.	—	—	—	treibt
6. XII.	—	—	—	„
7. XII.	—	—	—	„
8. XII.	—	—	beginnt	„
9. XII.	—	—	treibt	Schuppen
10. XII.	—	treibt	„	lösen sich
11. XII.	treibt	„	„	Entfaltung
12. XII.	„	geschädigt	—	Blättchen

Ein paralleler Dunkelversuch zeigt in gleicher Zeit keine Entwicklung.

7. Versuch. Aufgestellt am 21. November 1922.

Tag	Injektionen der Knospen mit			
	Wasser	Methylenblau		
		1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000
1. XII.	—	—	treibt	treibt
2. XII.	—	—	„	„
3. XII.	—	—	„	„
4. XII.	—	—	„	„
5. XII.	—	—	„	Entfaltung
6. XII.	—	—	Entfaltung	„
7. XII.	—	—	„	„
8. XII.	—	—	Blättchen	Blättchen
9. XII.	—	—	„	„
10. XII.	—	—	„	„
11. XII.	treibt	geschädigt	„	„
12. XII.	„	—	„	„

Ein paralleler Dunkelversuch zeigt in gleicher Zeit keine Entwicklung.

8. Versuch. Aufgestellt am 3. Januar 1923.

Tag	Injektionen der Knospen mit				
	Wasser	Uranylsulfat 1 und 0,5 Proz.	Ferrisulfat 1 Proz.	Ferrisulfat 0,5 Proz.	Ferrosulfat 1 und 0,5 Proz.
16. I.	—	treibt	—	—	—
17. I.	—	„	—	treibt	treibt
18. I.	—	Schuppen	—	„	„
19. I.	—	lösen sich	geschädigt	Schuppen	Schuppen
20. I.	treibt	Entfaltung	„	lösen sich	lösen sich
21. I.	„	kl. Blättchen	abgestorben	Entfaltung	Entfaltung
22. I.	„	„ „	—	Blättchen	Blättchen

Fagus silvatica.

11. Versuch. Aufgestellt am 7. Januar 1923.

Tag	Nach Entfernung der äußeren Knospenschuppen gebadet in		Tag	Nach Entfernung der äußeren Knospenschuppen gebadet in	
	Wasser	Methylenblau 1 : 20 000		Wasser	Methylenblau 1 : 20 000
13. I.	—	treibt	19. I.	—	Schuppen
14. I.	—	„	20. I.	—	lösen sich
15. I.	—	„	21. I.	—	Entfaltung
16. I.	—	„	22. I.	treibt	„
17. I.	—	„	23. I.	„	Blättchen
18. I.	—	„			



Abb. 1. Buchenzweige, 6 Stunden gebadet: links in Wasser, rechts in Methylenblau 1 : 20000, beide im Lichte nach 20 Tagen.

12. Versuch. Aufgestellt am 6. Februar 1923.

Tag	Injektionen der Knospen mit		Tag	Injektionen der Knospen mit	
	Wasser	Eosin 1 : 5000		Wasser	Eosin 1 : 5000
12. II.	—	treibt	15. II.	treibt	treibt
13. II.	—	„	16. II.	„	Blättchen
14. II.	treibt	„			

Ein paralleler Dunkelversuch zeigt in gleicher Zeit keine Entwicklung. Siehe Abb. 2.

13. Versuch. Aufgestellt am 7. Januar 1923.

Tag	Injektionen der Knospen mit		Tag	Injektionen der Knospen mit	
	Wasser	Uranylsulfat 1 und 0,5 Proz.		Wasser	Uranylsulfat 1 und 0,5 Proz.
24. I.	—	treibt	27. I.	treibt	Entfaltung
25. I.	—	„	28. I.	„	Blättchen
26. I.	treibt	„			

Siehe Abb. 3.

Corylus Avellana.

Mit Haselnußkätzchen ausgeführte Treibversuche wurden zu spät, erst im Dezember ausgeführt, also zu einer Zeit, wo die Winterruhe dieses Strauches schon ausklingt. Die Vorbehandlung mit Lichtkatalysatoren zeigte daher gegenüber destilliertem Wasser keinen Vorsprung; höhere

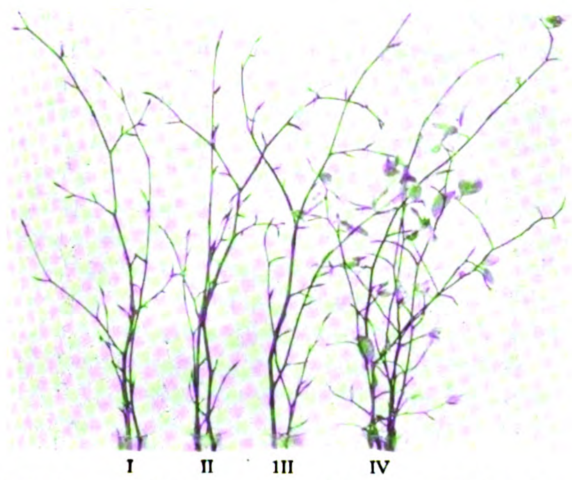


Abb. 2. Buchenknospen, injiziert: I und II mit Wasser, III und IV mit Eosin 1 : 5000, I und IV im Lichte, II und III im Dunkeln nach 10 Tagen.



Abb. 3. Buchenknospen, injiziert: Mitte mit Wasser, links mit 1 Proz., rechts mit 0,5 Proz. Uranylsulfat, alle im Lichte nach 22 Tagen.

Konzentrationen schädigten. In parallel verlaufenden Dunkelversuchen erfolgte aber während der Versuchsdauer von 10 Tagen kein Austreiben, so daß auch hier eine günstige Wirkung des Lichtes allein festgestellt werden konnte.

Cydonia japonica, Cornus sanguinea.

Auch bei diesen Pflanzen war die Winterruhe der Knospen zur Zeit der Versuchsanstellung (Dezember) beendet. Versuche bei Lichtabschluß wurden nicht ausgeführt.

Wie Tabelle I zeigt, lassen sich recht allgemein Beschleunigungen im Austreiben von ruhenden Winterknospen der verschiedenen Holzgewächse durch Applizierung gewisser zu photokatalytischer Wirkung befähigter Farbstoffe und Metallsalze mit daran anschließender Belichtung erzielen. Recht beträchtlich ist diese Beschleunigung unter sonst gleichen Bedingungen bei Tilia, Fagus, Betula, Sambucus und Alnus. Bei den übrigen untersuchten Pflanzen ist sie kleiner, aber dennoch deutlich. Wie bei sonstigen Treibverfahren, ist der Erfolg bei derselben Pflanzenart von der Tiefe der Ruheperiode abhängig, die allmählich, je nach der Spezies, früher oder später in eine unfreiwillige, durch die ungünstigen Außenbedingungen des Winters bedingte Ruhe übergeht. Die Unwirksamkeit in sonst günstigen Konzentrationen eingeführter Farbstoffe dürfte bei Coryluskätzchen, Cydonia- und Cornusknospen auf die schon ausgeklungene Winterruhe zurückzuführen sein. Selbstverständlich bleibt eine günstige Wirkung der Photokatalysatoren auch dann aus, wenn ihre Verdünnung eine zu hohe ist. Umgekehrt schädigen sehr hohe Farbstoffkonzentrationen die Knospenentfaltung gegenüber den Kontrollen.

In optimalen Konzentrationen angewendet, beschleunigten Eosin und Erythrosin die Knospenentwicklung bei folgenden Pflanzen: Sambucus (Bad), Syringa (Bad und Injektion), Aesculus (Injektion), Prunus avium (Injektion) im Dezember, Quercus (Bad), Robinia (Bad und Alnus (Injektion) im Januar; Tilia (Injektion im November und Bad im Januar), Betula (Bad im Dezember und Januar), Fagus (Injektion im November, Bad und Injektion im Januar).

Die günstige Wirkung des Methylenblaus trat öfter erst in einer späteren Phase der Entwicklung hervor; ja, es kann vorkommen, daß Methylenblau erst hemmend wirkt und der fördernde Einfluß erst später sichtbar wird. Methylenblau in geeigneten Verdünnungen angewendet, beschleunigte bei nachstehenden Pflanzen das Knospenwachstum: Sambucus (Bad) im Dezember, Betula (Bad) im Dezember und Januar, Fagus (Injektion im November, Bad und Injektion im Januar), Tilia (Injektion im November und Bad im Januar).

Im allgemeinen bringt das mehrstündige Baden bessere Erfolge als die Injektion der Knospen. Da die injizierten Mengen klein sind, führen bei dieser Methode höhere Konzentrationen zum gleichen Ziele wie niedrigere bei der Anwendung von Bädern. Eosin und Erythrosin zeigen in ihrer Wirkung keinen Unterschied, für Injektionen sind die Lösungen 1 : 5000 und 1 : 10000 am günstigsten, 1 : 1000 stellt eine zu

starke Lösung dar und schädigt; 1 : 20000 und 1 : 50000 übt keinerlei Wirkung mehr aus; bei Badeversuchen sind Lösungen 1 : 10000 und 1 : 20000 am besten. Für Methylenblau als leicht permeierenden Farbstoff gilt im allgemeinen die Regel, etwas niedrigere Konzentrationen anzuwenden; für die Injektion kommen 1 : 10000 und 1 : 20000 in Betracht, für das Bad 1 : 20000.

Was die Einwirkung der Metallsalze anbelangt, so förderten sie in den angewendeten Konzentrationen von 0,5 und 1 Proz. alle das Austreiben der Knospen, wenn auch im allgemeinen etwas weniger als die Farbstoffe.

Bemerkenswert ist der große Einfluß, den das Licht allein auf das Austreiben der Knospen unserer Holzgewächse ausübte. Denn die unter Lichtabschluß stehenden Parallelversuche zeigten innerhalb der Versuchszeit, in der die belichteten Knospen schon recht weit entwickelt waren, noch keine Fortschritte. Nach den bisher vorhandenen, eingangs mitgeteilten Literaturangaben wirkte dieses Ergebnis etwas überraschend; in künftigen Versuchen wird diese offenkundige Abhängigkeit des Austreibens vom Lichte näher zu untersuchen sein. Für unsere hier schon mitgeteilten Versuche hat diese Tatsache insofern eine Bedeutung, als sie es wahrscheinlich macht, daß ganz allgemein eine gewisse Lichtempfindlichkeit ruhender Knospen besteht; durch die eingeführten Photokatalysatoren würde diese Lichtempfindlichkeit dann verstärkt werden. Die winzigen schon wirksamen Mengen — besonders bei den Injizierungsversuchen ist dies augenscheinlich — sprechen für die katalytische Natur dieser Vorgänge. Ob ein Verbrauch der eingeführten Stoffmengen stattfindet, läßt sich aus naheliegenden Gründen nicht nachweisen, jedenfalls kommt es mit dem Einsetzen des Streckungswachstums zu einer noch weiteren Verdünnung der ohnehin geringen Quantitäten, die aber für die einmal in Gang gesetzten Wachstumsprozesse offenbar belanglos ist. Vielleicht steht mit dieser Verdünnung der erwähnte Umschlag einer anfänglich hemmenden Methylenblauwirkung in eine die weitere Knospenentfaltung fördernde im ursächlichen Zusammenhang. Weil die eingeführten Stoffe nur im Lichte wirken, im Dunkeln aber eine Wirkung unter den gegebenen Versuchsbedingungen ausbleibt, ist auch der Charakter einer photokatalytischen Reaktion gegeben. Die Möglichkeit, den günstigen Einfluß des Lichtes allein auf das Knospentreiben durch einen in die Knospen eingeführten Photokatalysator zu erhöhen, macht es, wie eingangs erwähnt, wahrscheinlich, daß die schon von vornherein vorhandene Lichtempfindlichkeit ruhender Knospen auf der Gegenwart von natürlich in Knospen vorkommenden Photokatalysatoren beruht. Als solche kämen von fluoreszierenden Farbstoffen das Chlorophyll, vielleicht auch das Aesculin, von Salzen vor allem die des Eisens in

*

Frage, dessen Einverleibung auch tatsächlich die Ruhe abzukürzen vermochte. Weil Chlorophyll und Aesculin die bekannten photodynamischen Wirkungen ebenso wie z. B. das Eosin hervorzubringen vermögen, ist zu erhoffen, daß diese Stoffe auch das Austreiben ruhender Winterknospen beschleunigen werden, worüber künftige Versuche Aufschluß bringen sollen.

Die hier mitgeteilte Beobachtung, daß der das Austreiben begünstigende Einfluß eingeführter Lichtkatalysatoren in späteren Phasen der Ruheperiode immer schwächer wird und schließlich ausbleibt, ließe sich unter diesem Gesichtswinkel so verstehen, daß die Reaktionen, die in den ruhenden Knospen unter dem Einfluß schon vorhandener Lichtkatalysatoren verlaufen, schließlich eine Höhe erreichen, bei der es für das Austreiben gleichgültig ist, ob die Menge des Photokatalysators durch Zufuhr von außen vermehrt wird oder nicht.

Nach unseren heutigen Ansichten erblicken wir in den Photokatalysatoren Stoffe, die auf irgend eine Weise Oxydationen fördern, sei es, daß nach *Noacks*[1]) Untersuchungen über die Oxydation gewisser pflanzlicher Chromogene, das Eosin mit der Oxygenase, das Mangansulfat mit der Peroxydase in dem von *Bach* und *Chodat* aufgestellten System in Analogie gestellt würde. Man könnte sich also vorstellen, daß auch die ruheabkürzende Wirkung von in die Knospen eingeführten Photokatalysatoren primär auf einer Steigerung von Oxydationsprozessen, der Atmung im weiteren Sinne, beruht, so daß das hier mitgeteilte Treibverfahren jenen Treibmitteln an die Seite gestellt werden könnte, die gleichfalls eine Erhöhung der Atmung nach sich ziehen. Diesen Vorgängen scheint am nächsten die von *Weber* beobachtete frühtreibende Wirkung eines Wasserstoffsuperoxydbades zu stehen. Dieses Peroxyd hat *Noack* bekanntlich zu Modellversuchen herangezogen und gefunden, daß es die Wirkung belichteten Eosins bei der Oxydation von Atmungschromogenen zu ersetzen vermag. Die zu erhoffende Aufklärung des Wesens photodynamischer Wirkungen durch künftige Forschung dürfte auch das Problem des Lichttreibens ruhender Knospen aufhellen und vielleicht auch auf die Wirkung der Frühtreibmittel überhaupt einiges Licht werfen.

2. Teil:

Zur Photokatalyse der Samenkeimung.

Methodik.

Wie früher besprochen, handelte es sich darum, den Einfluß von Lichtkatalysatoren auf die Keimung von an und für sich schon lichtempfindlichen Samen zu untersuchen. Zunächst galt es nun, derartige Samen ausfindig

---

[1]) *K. Noack*, Zeitschr. f. Bot. **12**, 293, 1920.

zu machen. Bekanntlich[1]) beeinflussen die Standortsverhältnisse, unter denen der Samen gereift ist, und die Nachreifevorgänge sein späteres Verhalten dem Lichte gegenüber, also Faktoren, die bei der Verwendung gekaufter Samen unbekannt waren.

Bei der von mir angewendeten Versuchsanordnung, die im folgenden beschrieben ist, keimen nur am Lichte, im Dunkeln gar nicht: Samen von Apium graveolens und Epilobium montanum. Wesentlich höhere Keimprozente wiesen im Lichte folgende Samen auf: Epilobium hirsutum, Oenothera biennis, Digitalis lutea, Digitalis purpurea, Salvia verticillata, Rumex alpinus, Brunella grandiflora und Sempervivum tectorum. Bei folgenden Samen waren die Keimprozente im Dunkeln höher: Digitalis ferruginea, Amaranthus caudatus, Papaver Rhoeas, Saxifraga caespitosa, Globularia nudicaulis und Sedum acre. Eine Reihe von Samen wie Chelidonium majus, Triticum vulgare, Avena sativa, Pisum sativum, Digitalis ambigua und andere mehr keimten licht und dunkel ungefähr gleich gut.

Zu den Versuchen diente eine Auswahl jener Pflanzen, deren Samen nur am Lichte keimen oder in größerer Zahl als im Dunkeln aufgehen, ferner als Vergleichsobjekte die Samen von Digitalis ferruginea und Pisum sativum. Zur näheren Kennzeichnung der in den Versuchen verwendeten Samen sei folgendes erwähnt: Die Samen von Apium graveolens und Epilobium montanum brachten es, wie gesagt, bei Lichtausschluß während der Versuchsdauer zu keiner Keimung. Epilobium hirsutum keimte nach 7 bis 8 Tagen im Lichte zu 100, im Dunkeln zu 60 Proz., Oenothera biennis nach 4 Tagen im Lichte zu 68, im Dunkeln zu 24 Proz., nach 11 Tagen im Lichte zu 98, im Dunkeln zu 56 Proz. aus. Bei Digitalis lutea beschleunigte das Licht das Aufgehen der Samen (nach 6 Tagen 32 Proz. im Licht, 6 Proz. im Dunkeln), schließlich aber — nach 11 Tagen — keimten ungefähr gleichviel Samen im Licht und und im Dunkeln (98 : 90 Proz.). Auch bei Digitalis purpurea beschleunigte das Licht den Samenaufgang: nach 9 Tagen 24 Proz. im Licht, 12 Proz. im Dunkeln. Die Samen von Digitalis ambigua waren nach 9 Tagen im Lichte und im Dunkeln zu 96 Proz. ausgekeimt, nur in den ersten Tagen war ein kleiner Vorsprung bei den belichteten Samen zu beobachten. Bei Digitalis ferruginea blieben die Lichtsamen gegenüber den Dunkelsamen in der Keimzahl anfänglich zurück, die hemmende Lichtwirkung hörte später aber auf, so daß nach 7 Tagen im Licht und im Dunkeln die Samen zu 100 Proz. ausgekeimt waren. Auch bei Pisum sativum war eine kleine Verzögerung im Aufgehen durch das Licht zu beobachten, nach 3 Tagen betrug das Keimprozent im Licht 96, im Dunkeln 100 Proz.

Je 50 Stück der genannten Samen wurden bei Lichtausschluß in Eosin-, Methylenblau-, Uranyl- und Ferrisulfatlösungen und zur Kontrolle in destilliertem Wasser durch 6 Stunden quellen gelassen. Eosin und Methylenblau wurden in Konzentrationen 1 : 1000 bis 1 : 200000 verwendet, die Metallsalze in solchen von 1, 0,5, 0,1 und 0,01 Proz. Die Kontrollversuche (Quellung in destilliertem Wasser) gelangten meist in mehrfacher Wiederholung zur Aufstellung, um über die Größe der Schwankungen der Keimprozente ein genaues Bild zu bekommen. Diese Schwankungen waren im allgemeinen sehr gering. Ferner wurde stets eine gleichbehandelte Versuchsreihe, dauernd verdunkelt, unter sonst gleichen Be-

[1]) *W. Kinzel*, Frost und Licht als beeinflussende Kräfte bei der Samenkeimung. Stuttgart 1912, 1915 und 1920.

dingungen aufgestellt. Als Keimkästen dienten dieselben Kisten wie bei den Treibversuchen. In dreiviertel Höhe der Kiste wurde ein Einsatz angebracht, dessen lotrechter Abstand von der Lampe 20 cm betrug, und darauf wurden im Kreise um die Lampe die Petrischalen aufgestellt, in welchen die Samen auf mit destilliertem Wasser angefeuchteten Filtrierpapier ausgelegt worden waren. Die Abdunklung der Petrischalen in der bei Lichtabschluß gehaltenen parallelen Versuchsreihe erfolgte mit schwarzem Papier, auf das, um jede störende Erwärmung zu vermeiden, weißes geklebt wurde. Die Wärmestrahlen der 300kerzigen Nitralampe wurden durch Zwischenschaltung eines Wassermantels von 10 cm Dicke ausgeschaltet. Die Lampe wurde zu diesem Zwecke in ein Becherglas eingeführt, das seinerseits in eine von Wasser durchströmte Glasglocke tauchte. Die Temperatur in der Höhe der Schalen betrug 20 bis 22° C im Lichte wie im Dunkeln. Auf die im Kreis unterhalb der Lampe gestellten Dunkelschalen wurden die gleichbehandelten Schalen der Lichtreihe gesetzt. Täglich wurde die Zählung der ausgekeimten Samen vorgenommen, die der Dunkelreihe in einem dunklen Zimmer.

Die Zahl der ausgekeimten Samen ist in den folgenden Tabellen wiedergegeben; weil stets 50 Samen für jede Konzentration im Lichte sowohl wie im Dunkeln verwendet wurden, ergibt sich aus ihnen durch Multiplikation mit 2 das Keimprozent. Nur bei der zum Vergleiche herangezogenen Erbse wurden je 30 Samen aufgelegt.

Zunächst soll wieder eine tabellarische Zusammenstellung (Tabelle II) den in der Keimzahl sich zeigenden Einfluß der Lichtkatalysatoren im Lichte und im Dunklen gegenüber den Kontrollen zeigen. In der letzten Kolumne dieser Tabelle sind einerseits die nach einer gewissen Zeit beobachteten, meist maximalen Unterschiede in der Keimzahl der mit Photokatalysatoren behandelten Samen am Lichte gegenüber dem Mittel der im Wasser vorgequellten und am Lichte ausgekeimten Samen, andererseits die Unterschiede zwischen den entsprechenden Dunkelversuchen angegeben. Die Zahlen mit +-Vorzeichen geben die Erhöhung, die mit —-Vorzeichen die Erniedrigung der Keimzahl den Wasserkontrollen gegenüber an.

Dann folgen, um Raum zu sparen, nur einzelne dieser Versuche in ausführlicher Mitteilung, aus denen der Verlauf der Keimung hervorgeht.

Tabelle II.

Pflanze	Versuchsbeginn	Vorbehandlung der Samen	Zahl der gekeimten Samen			Unterschied der Keimzahl gegen Wasser	
			nach Tagen	im Licht	i. Dunkeln	Licht	Dunkel
Apium graveolens	12. IV.	Dest. Wasser	7	11	0	—	—
		Eosin 1 : 10 000	7	24	0	+ 13	0
		Dest. Wasser	10	25	0	—	—
		Methylenblau 1 : 10 000	10	3	0	— 22	0

Tabelle II (Fortsetzung).

Pflanze	Versuchs-beginn	Vorbehandlung der Samen	Zahl der gekeimten Samen: nach Tagen	im Licht	i. Dunkeln	Unterschied der Keimzahl gegen Wasser: Licht	Dunkel
Apium graveolens	8. V.	Dest. Wasser	13	25	0	—	—
		Eosin 1 : 5 000	13	36	0	+ 11	0
		" 1 : 10 000	13	28	0	+ 3	0
		" 1 : 20 000	13	32	0	+ 7	0
		" 1 : 50 000	13	33	0	+ 8	0
		Dest. Wasser	17	30	0	—	—
		Methylenblau 1 : 10 000	17	1	0	— 29	0
		" 1 : 20 000	17	3	0	— 27	0
		" 1 : 50 000	17	3	0	— 27	0
		Ferrisulfat 1 Proz.	17	23	0	— 7	0
		Uranylsulfat 1 "	17	27	0	— 3	0
	30. V.	Dest. Wasser	11	22	0	—	—
		Methylenblau 1 : 100 000	11	27	0	+ 5	0
		" 1 : 200 000	11	23	0	+ 1	0
		Ferrisulfat 0,5 Proz.	11	13	0	— 9	0
		" 0,1 "	11	16	0	— 6	0
		Uranylsulfat 0,5 "	11	21	0	— 1	0
		" 0,1 "	11	33	0	+ 11	0
Epilobium montanum	28. IV.	Dest. Wasser	5	16	0	—	—
		Eosin 1 : 10 000	5	10	0	— 6	0
	17. V.	Dest. Wasser	9	38	0	—	—
		Methylenblau 1 : 20 000	9	1	0	— 37	0
		Dest. Wasser	5	15	0	—	—
		Eosin 1 : 20 000	5	40	0	+ 25	0
		Ferrisulfat 1 Proz.	5	22	0	+ 7	0
		Uranylsulfat 1 "	5	28	0	+ 13	0
Epilobium hirsutum	12. IV.	Dest. Wasser	3	34	2	—	—
		Eosin 1 : 10 000	3	39	4	+ 5	+ 2
		Dest. Wasser	4	38	2	—	—
		Methylenblau 1 : 20 000	4	4	2	— 34	0
	14. IV.	Dest. Wasser	3	15	0	—	—
		Eosin 1 : 10 000	3	23	0	+ 8	0
		Methylenblau 1 : 20 000	3	4	0	— 11	0
	7. V.	Dest. Wasser	6	50	28	—	—
		Methylenblau 1 : 10 000	6	22	12	— 28	— 16
		Eosin 1 : 1 000	6	40	22	— 10	— 6
		Dest. Wasser	3	33	12	—	—
		Eosin 1 : 1 000	3	24	9	— 9	— 3
		" 1 : 10 000	3	40	11	+ 7	— 1
		" 1 : 20 000	3	37	12	+ 4	0
		" 1 : 50 000	3	50	22	+ 17	+ 10
		Methylenblau 1 : 10 000	3	16	7	— 17	— 5
		" 1 : 20 000	3	39	2	+ 6	— 10
		" 1 : 50 000	3	44	4	+ 11	— 8
		Ferrisulfat 1 Proz.	3	44	6	+ 11	— 6
		Uranylsulfat 1 "	3	43	6	+ 10	— 6

Tabelle II (Fortsetzung).

Pflanze	Versuchsbeginn	Vorbehandlung der Samen		Zahl der gekeimten Samen: nach Tagen	im Licht	i. Dunkeln	Unterschied der Keimzahl gegen Wasser: Licht	Dunkel
Oenothera biennis	15. V.	Dest. Wasser		3	20	—	—	—
		Eosin	1 : 1 000	3	16	—	— 4	—
		„	1 : 10 000	3	19	—	— 1	—
		„	1 : 20 000	3	19	—	— 1	—
		„	1 : 50 000	3	33	—	+ 13	—
		Dest. Wasser		4	34	12	—	—
		Methylenblau	1 : 10 000	4	26	9	— 8	— 3
		„	1 : 20 000	4	37	10	+ 3	— 2
		„	1 : 50 000	4	36	10	+ 2	— 2
		Ferrisulfat	1 Proz.	4	36	10	+ 2	+ 2
		Uranylsulfat	1 „	4	40	12	+ 6	0
Digitalis lutea	29. IV.	Dest. Wasser		4	16	2	—	—
		Eosin	1 : 10 000	4	12	5	— 4	+ 3
	27. V.	Dest. Wasser		6	16	3	—	—
		Eosin	1 : 20 000	6	22	2	+ 6	— 1
		„	1 : 50 000	6	34	1	+ 18	— 2
		„	1 : 100 000	6	19	1	+ 3	— 2
		Methylenblau	1 : 20 000	6	2	0	— 14	— 3
		„	1 : 50 000	6	14	3	— 2	0
		„	1 : 100 000	6	37	4	+ 21	+ 1
		Ferrisulfat	0,5 Proz.	6	15	1	— 1	— 2
		Uranylsulfat	0,5 „	6	22	4	+ 6	+ 1
Digitalis purpurea	2. V.	Dest. Wasser		6	3	7	—	—
		Eosin	1 : 10 000	6	6	8	+ 3	+ 1
	30. V.	Dest. Wasser		7	7	6	—	—
		Eosin	1 : 20 000	7	4	6	— 3	0
		„	1 : 50 000	7	11	6	+ 4	0
		„	1 : 100 000	7	8	2	+ 1	— 4
		Dest. Wasser		11	12	6	—	—
		Methylenblau	1 : 20 000	11	6	1	— 6	— 5
		„	1 : 50 000	11	10	1	— 2	— 5
		„	1 : 100 000	11	16	4	+ 4	— 2
		Ferrisulfat	1 Proz.	11	17	1	+ 5	— 5
		Uranylsulfat	1 „	11	18	3	+ 6	— 3
Digitalis ambigua	7. VI.	Dest. Wasser		5	25	21	—	—
		Eosin	1 : 50 000	5	28	20	+ 3	— 1
		Methylenblau	1 : 100 000	5	28	21	+ 3	0
		Dest. Wasser		7	32	30	—	—
		Ferrisulfat	0,5 Proz.	7	40	31	+ 8	+ 1
Digitalis ferruginea	2. VI.	Dest. Wasser		5	15	33	—	—
		Eosin	1 : 50 000	5	6	34	— 9	+ 1
		Uranylsulfat	0,5 Proz.	5	11	34	— 4	+ 1
		Dest. Wasser		6	35	50	—	—
		Ferrisulfat	0,5 Proz.	6	41	50	+ 6	0

Tabelle 11 (Fortsetzung).

Pflanze	Versuchsbeginn	Vorbehandlung der Samen		Zahl der gekeimten Samen nach Tagen	im Licht	i. Dunkeln	Unterschied der Keimzahl gegen Wasser Licht	Dunkel
Pisum sativum (je 30 Samen)	11. VI.	Dest. Wasser		3	28	30	—	—
		Eosin	1: 1 000	3	15	30	—13	θ
		"	1 : 10 000	3	25	30	— 3	θ
		"	1 : 20 000	3	26	29	— 2	— 1
		Methylenblau	1 : 10 000	3	26	30	— 2	θ
		"	1 : 20 000	3	29	30	+ 1	θ
		"	1 : 50 000	3	30	30	+ 2	θ
		Uranylsulfat	0,5 Proz.	3	26	30	— 2	θ

Apium graveolens.

1. Versuch. Aufgestellt am 8. Mai 1924 am Lichte.

Die Ziffern geben hier und im folgenden die Zahl der aufgegangenen Samen an.

Tag	Wasser 1	2	3	4	Eosin 1 : 5000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 50 000
13. V.	—	—	—	—	3	1	—	3
14. V.	4	3	4	4	7	2	7	7
15. V.	11	10	10	10	16	5	15	14
16. V.	13	11	11	11	19	10	15	20
17. V.	13	15	14	14	26	14	22	25
18. V.	21	21	20	20	32	22	23	27
19. V.	23	21	20	20	33	23	27	29
20. V.	24	25	24	24	34	27	32	31
21. V.	24	26	24	25	36	28	32	33
22. V.	28	28	28	28	36	33	32	34
23. V.	29	29	29	29	40	34	32	36
24. V.	29	29	29	29	44	34	34	36
25. V.	30	29	30	29	45	35	34	37

Tag	Wasser 1	2	3	4	Methylenblau 1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 50 000	Ferrisulfat 1 Proz.	Uranylsulfat 1 Proz.
13. V.	—	—	—	—	1	3	1	—	—
14. V.	4	3	4	4	1	3	2	—	1
15. V.	11	10	10	10	1	3	2	2	3
16. V.	13	11	11	11	1	3	2	4	3
17. V.	13	15	14	14	1	3	2	4	3
18. V.	21	21	20	20	1	3	2	5	3
19. V.	23	21	20	20	1	3	2	9	9
20. V.	24	25	24	24	1	3	2	10	16
21. V.	24	26	24	25	1	3	2	13	22
22. V.	28	28	28	28	1	3	2	16	23
23. V.	29	29	29	29	1	3	2	20	24
24. V.	29	29	29	29	1	3	3	23	27
25. V.	30	29	30	29	1	3	3	23	27

Eine gleiche Versuchsreihe, die unter Lichtabschluß gehalten wurde, zeigte in gleicher Zeit keine Keimung. Im Lichte regen alle angewendeten Eosinkonzentrationen die Keimung günstig an. Die im Wasser gequollenen Samen zeigen ein niedrigeres, wenig schwankendes Keimprozent. Auffallend ist die starke Hemmung durch Methylenblau. Auch die 1proz. Ferri- und Uranylsalze hemmen die Keimung.

2. Versuch. Aufgestellt am 30. Mai 1923 am Lichte.

Tag	Wasser		Methylenblau		Uranylsulfat		Ferrisulfat	
	1	2	1 : 100 000	1 : 200 000	0,5 Proz.	0,1 Proz.	0,5 Proz.	0,1 Proz.
5. VI.	6	3	2	—	—	4	—	1
6. VI.	6	5	4	4	2	8	—	3
7. VI.	6	6	7	7	5	16	4	5
8. VI.	11	11	10	11	8	17	6	7
9. VI.	21	22	25	21	16	26	12	13
10. VI.	22	23	27	23	21	33	13	16
11. VI.	25	25	28	25	25	38	20	22
12. VI.	29	27	29	30	28	40	25	25
13. VI.	32	28	29	30	28	43	28	34
14. VI.	33	32	30	34	32	43	30	36
15. VI.	33	33	32	35	32	45	30	36

Eine parallele Versuchsreihe unter Lichtabschluß zeigte keine Keimung. Im Lichte lassen die nunmehr angewendeten schwächeren Konzentrationen von Methylenblau und 0,1 Proz. Uranylsulfat erhöhte Keimungszahlen erkennen.

Bei den belichteten Versuchsreihen des ersten und zweiten Versuches wurden die Längen des Würzelchens und Hypokotyls gemessen; es wurde gegenüber den in Wasser gequollenen Samen durchweg eine Wachstumshemmung, auch bei jenen Versuchen, wo anfänglich das Keimprozent erhöht wurde, festgestellt, was auf einer photodynamischen Schädigung durch den Farbstoff bzw. das Salz beruhen dürfte, die aus dem Samen in das umgebende Filterpapier hineindiffundierten.

Epilobium hirsutum.

3. Versuch. Aufgestellt am 7. Mai 1923.

Tag	Wasser				Eosin				Methylenblau			Ferrisulfat	Uranylsulfat
	1	2	3	4	1 : 1000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 50 000	1 : 10 000	1 : 20 000	1 : 50 000	1 Proz.	1 Proz.
					Im Lichte:								
9. V.	23	19	22	22	18	32	27	23	4	30	28	31	30
10. V.	32	34	34	34	24	40	37	50	16	39	44	44	43
11. V.	43	43	43	43	35	50	44	50	18	44	47	50	50
12. V.	50	50	48	48	39	50	50	50	22	45	50	50	50
13. V.	50	50	50	50	40	50	50	50	22	50	50	50	50
14. V.	50	50	50	50	50	50	50	50	27	50	50	50	50

3. Versuch (Fortsetzung).

Tag	Wasser 1	Wasser 2	Wasser 3	Wasser 4	Eosin 1 : 1000	Eosin 1 : 10 000	Eosin 1 : 20 000	Eosin 1 : 50 000	Methylenblau 1 : 10 000	Methylenblau 1 : 20 000	Methylenblau 1 : 50 000	Ferrisulfat 1 Proz.	Uranylsulfat 1 Proz.
							Im Dunkeln:						
9. V.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
10. V.	11	12	12	12	9	11	12	22	7	2	4	6	6
11. V.	16	15	16	19	16	15	19	25	12	10	10	8	10
12. V.	20	24	24	25	22	20	22	25	12	16	16	13	16
13. V.	28	28	32	28	22	20	24	25	12	19	16	16	20
14. V.	28	28	32	32	28	28	28	25	27	19	26	27	29

Methylenblaulösungen und Eosinlösungen 1 : 10000 schädigen die Keimung. Alle anderen angewendeten Eosin- und Methylenblaulösungen erhöhen ein wenig die Keimzahl. Die beiden ausprobierten Metallsalzlösungen fördern das Auskeimen. Im Dunkeln keimen allgemein weniger Samen als im Lichte aus, gelegentlich sind hier Schädigungen durch die Vorbehandlung zu beobachten.

Oenothera biennis.

4. Versuch. Aufgestellt am 15. Mai 1923.

Tag	Wasser 1	Wasser 2	Wasser 3	Wasser 4	Eosin 1 : 1000	Eosin 1 : 10 000	Eosin 1 : 20 000	Eosin 1 : 50 000	Methylenblau 1 : 10 000	Methylenblau 1 : 20 000	Methylenblau 1 : 50 000	Ferrisulfat 1 Proz.	Uranylsulfat 1 Proz.
							Im Lichte:						
17. V.	4	2	3	3	10	4	2	10	3	17	7	8	8
18. V.	22	20	20	18	16	19	19	33	15	30	28	30	32
19. V.	35	34	34	33	28	30	30	36	26	37	36	36	40
20. V.	35	34	34	33	28	30	36	37	27	38	37	38	41
21. V.	35	35	34	35	30	30	—	37	28	38	37	38	42
22. V.	36	36	34	35	30	36	—	41	29	38	37	48	42
23. V.	42	42	45	42	46	38	—	42	29	45	37	50	50
24. V.	48	46	46	44	46	48	—	50	29	45	50	50	50
25. V.	50	49	49	48	46	48	—	50	30	50	50	50	50
26. V.	50	49	49	49	50	50	—	50	30	50	50	50	50
							Im Dunkeln:						
17. V.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
18. V.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
19. V.	10	12	13	12	8	14	14	10	9	10	10	10	12
20. V.	15	14	15	15	15	14	14	10	10	11	14	12	16
21. V.	15	14	15	15	15	15	15	15	12	15	16	14	16
22. V.	19	19	15	15	16	19	—	20	14	16	18	14	20
23. V.	24	25	24	24	20	20	—	24	18	18	20	14	26
24. V.	28	25	27	27	20	25	—	25	24	24	26	22	26
25. V.	28	28	28	28	20	26	—	26	24	24	27	24	26
26. V.	28	28	28	28	20	30	—	27	30	26	30	24	26

Im Lichte gehen die Samen rascher auf als im Dunkeln. Erst Eosin 1 : 50000 erhöht die Keimzahl im Lichte, desgleichen die höheren Methylen-

blauverdünnungen. Günstig und ziemlich anhaltend ist die Wirkung von 1 Proz. Ferri- und Uranylsulfat auf den Samenaufgang im Lichte.

Digitalis lutea.

5. Versuch. Aufgestellt am 27. Mai 1923.

Tag	Wasser 1	Wasser 2	Eosin 1 : 20 000	Eosin 1 : 50 000	Eosin 1 : 100 000	Methylenblau 1 : 20 000	Methylenblau 1 : 50 000	Methylenblau 1 : 100 000	Ferrisulfat 0,5 Proz.	Uranylsulfat 0,5 Proz.
					Im Lichte:					
1. VI.	3	3	2	11	9	—	—	14	10	6
2. VI.	16	15	22	34	19	2	14	37	15	22
3. VI.	40	40	42	47	41	9	35	48	40	50
4. VI.	44	44	47	47	46	15	37	48	45	50
5. VI.	45	44	48	48	48	18	39	50	45	50
6. VI.	46	46	48	49	48	20	42	50	46	50
7. VI.	48	49	48	49	48	20	44	50	48	50
					Im Dunkeln:					
1. VI.	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
2. VI.	3	4	2	1	1	0	3	4	1	4
3. VI.	16	15	16	16	16	16	16	16	16	16
4. VI.	24	25	26	26	24	16	26	24	26	24
5. VI.	40	40	35	40	40	26	40	40	40	39
6. VI.	44	45	40	40	46	46	42	45	40	40
7. VI.	44	45	40	40	46	46	42	45	40	40

Licht allein beschleunigt das Auskeimen. Deutlich und ansehnlich ist die anfängliche Steigerung des Keimprozentes durch Eosin 1 : 50000 und Methylenblau 1 : 100000 im Lichte. Günstig wirkt auch 0,5 Proz. Uranylsulfat. Im Dunkeln Hemmung durch die höheren Farbstoffkonzentrationen.

Die hier nur auszugsweise mitgeteilten Versuche bieten ein recht verschiedenartiges Bild. Auch hier hängt es von der Konzentration des angewendeten Lichtkatalysators ab, ob es im Lichte zu einer Erhöhung oder Herabsetzung der Keimprozente kommt, und in geeigneten Konzentrationen wirken beiderlei Photokatalysatoren, Farbstoffe und Metallsalze, günstig. Wo die Grenze zwischen diesen beiden gegensätzlichen Wirkungen liegt, hängt von der Pflanzenart ab. Doch ist natürlich eine Feststellung der im Sameninnern wirksamen Konzentrationen hier ebensowenig möglich wie im Innern ruhender Knospen.

Methylenblau 1 : 10000 schädigt fast überall stark die Keimung der Samen im Lichte. Auch in einer 1 : 20000 betragenden Verdünnung drückt es die Keimzahl stark herab, in geringerem Grade nur bei Digitalis purpurea; bei Oenothera biennis erhöht es sogar schon etwas das Keimprozent, ebenso in einem Falle bei Epilobium hirsutum. Methylenblau 1 : 50000 setzt die Keimzahl nur bei Apium graveolens wesentlich herab, bei Digitalis lutea und purpurea verzögert es das Aufgehen nur in geringem Maße, bei Oenothera biennis und Pisum sativum erhöht es unwesentlich die Keimzahl, nur bei Epilobium hirsutum bewirkt es anfänglich einen starken Vorsprung im

Samenaufgang gegenüber den wassergequollenen Samen, der sich aber späterhin ausgleicht. Methylenblau 1 : 100000 wirkt nirgends mehr giftig und ist die günstigste Verdünnung für Digitalis lutea, wo es eine starke, wenn auch nur anfängliche Beschleunigung im Auskeimen der belichteten Samen zeitigt; bei Apium graveolens ist es die erste das Auskeimen deutlich beschleunigende Konzentration, bei Digitalis purpurea und ambigua führte es nur zu schwachen Steigerungen der Keimzahlen. Die nur bei Apium graveolens geprüfte Verdünnung 1 : 200000 erwies sich hier fast wirkungslos.

Eine ähnliche Unterschiedlichkeit im Aufgang zeigen die mit Eosin behandelten Samen im Lichte. Wo untersucht, behinderte Eosin 1 : 1000 das Auskeimen, bei Pisum sativum und Epilobium hirsutum stärker als bei Oenothera biennis. Die nur bei Apium graveolens in Anwendung gebrachte Verdünnung 1 : 5000 ergab hier die namhafteste Erhöhung des Keimprozents unter den sonst angewendeten noch höheren Verdünnungen dieses Farbstoffs, die auch während der ganzen Versuchszeit sich behauptete. Eosin 1 : 10000 verzögerte schwach und vorübergehend das Auskeimen bei Epilobium montanum, Oenothera biennis und Pisum sativum, hingegen bewirkte es bei Epilobium hirsutum eine schwache Beschleunigung des Auskeimens. Eosin 1 : 20000 behinderte etwas das Auskeimen der Samen von Oenothera biennis, Digitalis purpurea und Pisum sativum, führte zu einer schwachen vorübergehenden Erhöhung der Keimzahl bei Epilobium hirsutum und Digitalis lutea; bei Epilobium montanum aber beschleunigte es den Samenaufgang stark und anhaltend. Eosin 1 : 50000 erniedrigte vorübergehend die Keimzahl nur bei Digitalis ferruginea, sonst aber erhöhte es das Keimprozent, in geringerem Maße bei Digitalis purpurea und ambigua, namhaft, wenn auch nur anfänglich, bei Digitalis lutea, Epilobium hirsutum und Oenothera biennis. Die nur bei Digitalis lutea und purpurea angewandte Verdünnung 1 : 100000 wirkte hier noch etwas beschleunigend. Auch hier zeigt sich somit, daß von dem rascher eindringenden Methylenblau meist geringere Konzentrationen als von dem langsamer permeierenden Eosin nötig sind, um gleiche Wirkung auf den Samenaufgang zu erzielen.

Was nun die Wirkung der mineralischen Photokatalysatoren auf den Samenaufgang im Lichte anbelangt, ist das Bild ähnlich dem, welches die Farbstoffe bieten. Eine verhältnismäßig hohe Empfindlichkeit der Selleriesamen besteht auch dem Eisen- und Uranylsalz gegenüber, erst 0,1 Proz. Uranylsulfat führte hier zu einer ansehnlichen und anhaltenden Erhebung des Keimungsprozents, während 0,1 Proz. Ferrisulfat das Auskeimen dieser Samen in den ersten Keimungstagen noch hemmte. Bei Epilobium montanum und hirsutum, Oenothera biennis und Digitalis purpurea beschleunigen 1proz. Lösungen des Ferri- und Uranylsulfats den Samenaufgang zum Teil sehr auffällig; 0,5 Proz. Ferrisulfat erzielte eine kurzdauernde Beschleunigung des Samenaufgangs bei Digitalis ambigua und ferruginea, 0,5 Proz. Uranylsulfat bei Digitalis lutea.

Im Dunkeln hingegen ist dort, wo es überhaupt zu einer Keimung kommt, der Einfluß der verwendeten Farbstoffe und Mineralsalze auf den Samenaufgang im allgemeinen ein sehr geringer, besonders die kleinen Steigerungen der Keimzahl liegen zumeist innerhalb der Fehlergrenzen. Eine gewisse Ausnahme bilden nur die Samen von Epilobium hirsutum, wo gelegentlich größere, wenn auch vorübergehende Unterschiede im Keimprozent nach oben und unten festgestellt wurden.

Aber selbst in diesem Falle ergibt sich der große Einfluß, welchen die dargebotenen Stoffe auf den Samenaufgang im günstigen und schädlichen Sinne haben, erst durch die Kombination mit dem Lichte, so daß sie als Lichtkatalysatoren gekennzeichnet erscheinen.

Als wichtigstes Ergebnis dieser Keimungsversuche sei festgehalten, daß bei allen untersuchten Lichtkeimern durch Einführung geeigneter Konzentrationen von photokatalytisch wirksamen Stoffen die Keimprozente im Lichte mehr oder weniger erhöht werden können. Wir haben also hier ein ähnliches Verhalten wie bei der Photokatalyse des Frühtreibens ruhender Winterknospen. Stellt man die durch Lichtkatalysatoren überhaupt von uns im Lichte erzielten maximalen Erhöhungen der Keimungsprozente bei den untersuchten Pflanzensamen zusammen, so zeigt sich, daß sie am größten sind bei den strengen Lichtkeimern und bei jenen Pflanzen, deren Samen im Lichte besser als im Dunkeln aufgehen; relativ gering sind sie aber bei jenen Samen, welche licht und dunkel gleich gut oder im Lichte schlechter als im Dunkeln auskeimen. Es wird also die bei den Lichtkeimern schon vorhandene Lichtempfindlichkeit, welche sich in einer das Auskeimen ermöglichenden oder begünstigenden Wirkung des Lichtes kundgibt, durch Einführung von photokatalytisch wirksamen Stoffen gesteigert, und es ist daher, ebenso wie bei den lichtempfindlichen Winterknospen, naheliegend, anzunehmen, daß auch die Lichtkeimung in ihrem Wesen photokatalytischer Natur ist. Unsere Befunde scheinen uns somit die Anschauungen *Lehmanns* (l. c.) zu stützen, welcher das Wesen der Lichtwirkung auf Lichtkeimer in der photokatalytischen Beeinflussung von Abbaureaktionen im Sinne *Neubergs*[1]) erblickt. Dabei könnten die wohl immer anzutreffenden geringen Eisenmengen im Samen die Rolle des Lichtkatalysators spielen. Durch Zusatz von in derselben Weise wirksamen Stoffen kämen dann diese Reaktionen kräftiger in Schwung; geringe Mengen solcher Stoffe werden sie beschleunigen, größere können eine Störung des normalen Betriebes herbeiführen.

Wie erwähnt, gelang es *Simon* (l. c.) in einzelnen Fällen, auch bei solchen Pflanzensamen, deren Keimung durch das Licht sonst nicht begünstigt wird, durch Vorbelichtung der mit Eisen- und Uransalzen behandelten Samen das Keimprozent zu heben; seine Befunde zeigen aber kein einheitliches Bild. *Piskernik* (l. c.) hingegen berichtet, mit fluoreszierenden Farbstoffen an derartigen Samen im Lichte nur photodynamische Schädigungen des Keimlingswachstums — von kleinen Stimulationen desselben abgesehen — wahrgenommen zu haben. Wenn aber Pflanzensamen im Lichte schlechter keimen als im Dunkeln, wie es z. B. für die von uns untersuchten Samen von Digitalis ferruginea zutrifft, dann könnte man sich vorstellen, daß diese Samen zu hohe Mengen eines Lichtkatalysators enthalten, so daß es am

[1]) *C. Neuberg* und *A. Galambos*, diese Zeitschr. **61**, 315, 1914.

Lichte zu Störungen des normalen Keimungsstoffwechsels kommt und die Zufuhr eines ebenso wirkenden Stoffes, die hemmende Lichtwirkung, in der Regel nur noch verstärken wird. Freilich ist das hier von uns erbrachte Tatsachenmaterial noch zu dürftig, als daß es diese Anschauung ausreichend zu stützen vermöchte. Die verschiedene Konzentrationshöhe eines photokatalytisch wirksamen Stoffes, welche sich in bestimmter gleicher Weise z. B. optimal auf das Aufgehen der Samen auswirkt, kann deshalb nicht zur Grundlage für die entwickelten Vorstellungen genommen werden, weil ja die im Innern der Zellen herrschende Konzentration des eingedrungenen Stoffes unbekannt ist und sicherlich je nach der Durchlässigkeit des Samens für denselben verschieden sein wird.

Zusammenfassung.

Das Austreiben ruhender Winterknospen verschiedener einheimischer Holzgewächse wird durch Dauerbeleuchtung mit höheren Lichtintensitäten (Nitralampe 300 HK) beschleunigt.

Diese ruheabkürzende Wirkung des Lichtes wird durch Einführung von Photokatalysatoren (Eosin, Erythrosin, Methylenblau, Ferri- und Ferrosulfat, Uranylsulfat) geeigneter Konzentrationen in die Knospen mittels Injektion oder Bad verstärkt.

Auch Samen, deren Keimung durch das Licht begünstigt wird (Lichtkeimer), zeigen nach Vorbehandlung mit den genannten Lichtkatalysatoren in geeigneter Verdünnung und bei nachfolgender Belichtung eine Erhöhung der Keimungsprozente gegenüber den in destilliertem Wasser gequollenen und dann belichteten Samen.

Aus diesen Ergebnissen wird mit einer gewissen Wahrscheinlichkeit geschlossen, daß in den Pflanzen schon ursprünglich vorhandene Photokatalysatoren die Lichtempfindlichkeit der genannten Organe in Hinblick auf das Austreiben bzw. Auskeimen bedingen.

Über den Ionen-Antagonismus.

Von

R. Minakami.

(Aus dem biochemischen Institut der aichi-medizinischen Universität in Nagoya, Japan.)

(Eingegangen am 25. Juni 1924.)

Mit 13 Abbildungen im Text.

Die antagonistischen Wirkungen verschiedener Ionen sind seit 30 Jahren bekannt. Sie wurden an biologischen Objekten entdeckt und vielfach bestätigt, aber in verhältnismäßig seltenen Fällen an unbelebten physikochemischen Modellen gefunden.

Sidney Ringer[1]) beobachtete 1883, daß Froschmuskeln in reiner 0,7 proz. NaCl-Lösung nach Reizen bald in Zuckungen verfallen, daß sie aber nach Zusatz von kleinen Mengen von Ca- oder K-Salzen lange Zeit normal reaktionsfähig bleiben. *Locke*[2]) bestätigt diesen Befund, *Jaques Loeb*[3]) fand, daß die befruchteten Eier von Fundulus heteroclitus in einer reinen NaCl-Lösung von gleichem osmotischen Druck wie Meerwasser sich nicht entwickeln, daß aber Entwicklung eintritt, wenn man der Lösung kleine Mengen von zweiwertigen Kationen wie Ca- oder Mg zusetzte. *R. S. Lillie*[4]) beobachtete an der Cilien-Bewegung von Arenicola die antagonistische Wirkung von NaCl und zweiwertigen Kationen. *O. Warburg*[5]) beschrieb 1908 einen Versuch über die Wirkung von Ionen auf die Oxydationsgeschwindigkeit von Seeigeleiern. Er beobachtete, daß die Eier in einer reinen isotonischen NaCl-Lösung eine stark gesteigerte Atmung zeigen, aber nach Zusatz von etwas $CaCl_2$ auf das Normalmaß der Oxydation zurückkehren. Die antagonistischen Wirkungen sind sowohl zwischen K und Na, als auch zwischen einwertigen und zweiwertigen Kationen in diesen biologischen Versuchen festgestellt worden. Na allein wirkt giftig, und zwar giftiger als destilliertes Wasser. Zusatz von geeigneten Mengen von K oder zweiwertigen Kationen vermindert die giftige Wirkung oder hebt sie auf, und unter diesen antagonistischen Ionen finden sich sogar solche, welche allein sehr giftig sind, nämlich nicht nur Ca und Mg, sondern auch Sr, Ba, Pb, Zn, Ni.

---

[1]) *S. Ringer*, Journ. of Physiol. **4**, 1883.
[2]) *Locke*, Zentralbl. f. Physiol. **8**, 166, 1894.
[3]) *J. Loeb*, Pflügers Arch. **99**, 394, 1903.
[4]) *R. S. Lillie*, Amer. Journ. of Physiol. **17**, 89, 1906.
[5]) *O. Warburg*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **57**, 1, 1908.

Mehrere Versuche wurden ausgeführt, um diesen Ionenantagonismus auch an physiko-chemischen Modellen nachzuweisen. *Lindner* und *Picton*[1]) untersuchten 1895 das Fällungsvermögen von Ionengemischen beim Arsentrisulfid-Sol und fanden, daß bestimmte Ionen einander in ihrer Wirkung hemmen. *Wo. Pauli*[2]) beschrieb auch bei der Fällung von Eiweißlösungen durch Elektrolytgemische eine gegenseitige Hemmung, jedoch zeigen seine Versuche nicht einen eigentlichen einwandsfreien Antagonismus. *Sven Oden*[3]) beobachtete einen deutlichen Antagonismus der Ionen bei der Fällung von Schwefelsol durch Elektrolytgemische; die durch das eine Salz erzeugte Fällung wird durch ein zweites peptisiert. *W. Koch*[4]) beschreibt einen Antagonismus bei der Fällung von Lecithinsolen. *Neuschlosz*[5]) untersuchte die Veränderungen der Oberflächenspannung von Lecithinsolen durch Ionengemische und fand einen Antagonismus sowohl zwischen Na und Ca, wie auch zwischen Na und K. Gegen die Deutung von *Neuschlosz* sind aber von mehreren Seiten Einwände erhoben worden. *Freundlich* und *Scholtz*[6]) untersuchten die Wirkung von Elektrolytgemischen an dem *Oden*schen Schwefelsol und bestätigten die Beobachtung von *Oden*, fanden sie aber nicht bei dem *von Weimarn*schen Schwefelsol und am Goldsol. Sie bringen die Erscheinung in Zusammenhang mit der hydrophilen Natur des *Oden*schen Sols und führen sie auf eine Beeinflussung der Hydratation durch die Ionen zurück.

Die wirklich einwandsfreien Fälle von physiko-chemischen Modellen sind also nicht zahlreich, und es war daher erwünscht, einen neuen einwandsfreien Fall zu finden. Dies gelang bei der Untersuchung von *Seife* (*Natriumoleat*). Es wurden zwei Eigenschaften der Seifenlösung untersucht, die Oberflächenspannung und die Trübung durch Elektrolyte.

Die zeitliche Veränderung der Oberflächenspannung von Seifenlösungen.

Die Oberflächenspannung wurde mit einem *Traube*schen Stalagmometer gemessen in dem neueren Modell, bei welchem die Ausflußgeschwindigkeit durch Regulation des Luftzutritts von oben reguliert werden kann. Bei der sehr langsamen Ausflußgeschwindigkeit kann man annehmen, daß die gemessene Oberflächenspannung einigermaßen der statischen Oberflächenspannung nahekommt. Es zeigt sich nun zunächst, daß die auf diese Weise gemessene Oberflächenspannung vom Alter der Seifenlösung abhängig ist. Die Seifenlösung erleidet beim Aufbewahren sehr langsam eine Zustandsänderung, und somit ist die Oberflächenspannung selbst in reinem Wasser nicht nur eine Funktion der Konzentration und der Temperatur, sondern auch noch der Zeit. Wir müssen also zunächst den zeitlichen Verlauf der Zustandsänderung kennenlernen.

---

[1]) *Lindner* und *Picton*, Journ. of chem. Coc. **67**, 63, 1895.
[2]) *Wo. Pauli*, Hofmeisters Beitr. **5**, 27, 1903.
[3]) *Sven Oden*, Der kolloide Schwefel 1913.
[4]) *W. Koch*, Zeitschr. f. physiol. Chem. **37**, 181, 1903.
[5]) *Neuschlosz*, Pflügers Arch. **181**, 17, 1920.
[6]) *Freundlich* und *Scholtz*, Koll. chem. Beih. **16**, 267, 1922.

Die Tropfenzahl betrug bei dem Apparat für Wasser 71.5 bei 15,5° C, für eine 3 Stunden nach der Herstellung gemessene 0,1 proz. Seifenlösung 165, für eine 0,2 proz. 185. Die Abhängigkeit der Tropfenzahl von der Konzentration ist im einzelnen aus Tabelle I zu ersehen.

Tabelle I.

Konzentration (g pro ccm) .	0,002	0,001	0,000 5	0,000 25	0,000 125	0,000 063
Tropfenzahl .	185	164	144	112	75	71,5

Diese Versuche beziehen sich auf Lösungen, welche nach der Herstellung der definitiven Verdünnung mindestens 1 Stunde gestanden hatten. Wenn man nämlich eine gealterte Seifenlösung mit destilliertem Wasser verdünnt, so wird der definitive Zustand nicht sofort erreicht, sondern erst nach einer Stunde. Dann aber hält er sich konstant. Dieser Umstand ist noch aus einem anderen Grunde von Bedeutung für die folgenden Versuche. Die Seifenlösung ist nämlich schwach alkalisch, sie rötet Phenolphthalein mit mittlerer Intensität, und daher nimmt sie beim Stehen Kohlensäure aus der Luft auf, wodurch ihr p_H geändert wird. Davon kann man sich auch leicht überzeugen, indem man die Abblassung der Farbe des Phenolphthaleins beobachtet, wenn man die Lösung in einer flachen Schale und unter dauernden leichten Bewegungen der Luft gründlich aussetzt. Nun wäre es an sich denkbar, daß die hierbei eintretende Änderung des p_H einen Einfluß auf die Oberflächenspannung hätte, welcher dann nicht gut kontrollierbar wäre und die weiteren Versuche sehr erschweren würde. Obwohl nun die H-Ionen in etwas höheren Konzentrationen einen sehr starken Einfluß auf die Oberflächenspannung und auf alle anderen Zustandsgrößen der Seifenlösung haben, ist doch in dem Bereich von p_H, welcher hier in Betracht kommt, ein solcher Einfluß noch nicht nachweisbar. Folgender Versuch zeigt das. Eine frisch verdünnte, 0,1 proz. Seifenlösung wurde mit Phenolphthalein versetzt und in zwei Teile geteilt, der eine Teil zunächst in einem Reagenzglase ohne jede Luftblase verschlossen aufbewahrt und der andere Teil in einer flachen Schale so lange bewegt, daß eine möglichst extreme Änderung des p_H eintrat, welche das Phenolphthalein stark abblassen ließ, in einem Grade, wie es in den späteren Versuchen beim spontanen Stehen der Lösung gewiß nicht möglich war. Dann wurde in beiden Lösungen die Tropfenzahl gemessen unter denselben Bedingungen, wie in den späteren Versuchen. In der mit Luft in Berührung gewesenen Lösung war die Tropfenzahl um 3 geringer als in der anderen, ein Unterschied, der sich bei der graphischen Darstellung unserer Kurven kaum bemerkbar machen würde. In den weiteren Versuchen ist der Einfluß des p_H, wenn man auch für dessen *vollkommene* Konstanz keine Gewähr übernehmen kann, sicherlich noch kleiner.

Die folgenden Versuche beziehen sich auf die Einstellung der Oberflächenspannung, wenn eine 0,2proz. Seifenlösung mit dem gleichen Volumen verschiedener *Salzlösungen* versetzt wurde. Das Gleichgewicht wird hier viel langsamer erreicht als bei der Verdünnung mit destilliertem Wasser, es ist in der Regel noch nach 3 Stunden nicht definitiv. Das Gleichgewicht wird um so schneller erreicht, je konzentrierter die Salzlösung ist. Die erste Versuchsreihe bezieht sich auf NaCl und ist in Tabelle II und Abb. 1 wiedergegeben. Die angegebenen Salzkonzentrationen beziehen sich auf die definitive Mischung.

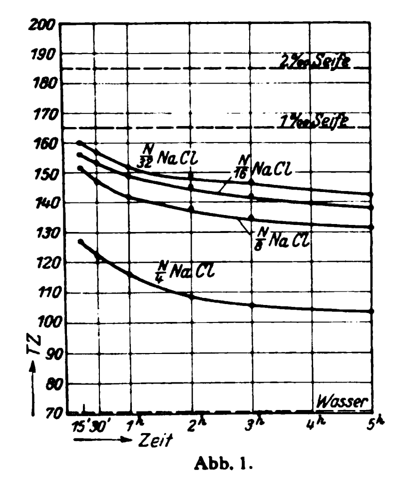


Abb. 1.

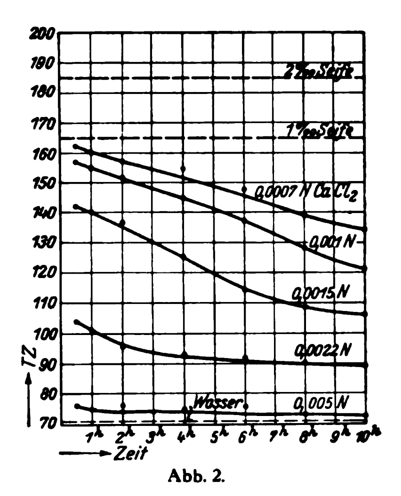


Abb. 2.

Tabelle II.

Konzentration	Zeit					
	15 Min.	30 Min.	1 Std.	2 Std.	3 Std.	5 Std.
0,25	127	122	116	108	105	104
0,125	151	146	142	138	135	131
0,0625	156	153	150	146	143	138
0,0313	160	157	153	150	146	142

Ähnliche Versuche für $CaCl_2$ sind in Tabelle III und Abb. 2 wiedergegeben.

Tabelle III.

Konzentration	Zeit						
	30 Min.	1 Std.	2 Std.	4 Std.	6 Std.	8 Std.	10 Std.
0,0050	76	75	77	75	76	73	72
0,0022	104	101	95	92	91	90	88
0,0015	143	140	137	124	114	108	106
0,0010	157	155	152	145	136	128	120
0,0007	162	160	157	155	148	139	133

Nunmehr wurde NaCl n/20 und $CaCl_2$ n/800 miteinander kombiniert. In Tabelle IV und Abb. 3 ist die Wirkung dieses Gemisches sowie das der beiden Komponenten einzeln eingetragen. Die Wirkung des Gemisches ist einfach die Summe der Wirkung der Komponenten, von einem Antagonismus ist nichts zu merken. Das ist jedoch anders bei einem Gemisch von LiCl n/20 und $MgCl_2$ n/1200, welches in Tabelle V und in Abb. 4 wiedergegeben ist. Die Kurve für das Gemisch verläuft zwischen den beiden Kurven der einzelnen Komponenten, und wir bemerken hier *zum erstenmal eine antagonistische Wirkung*.

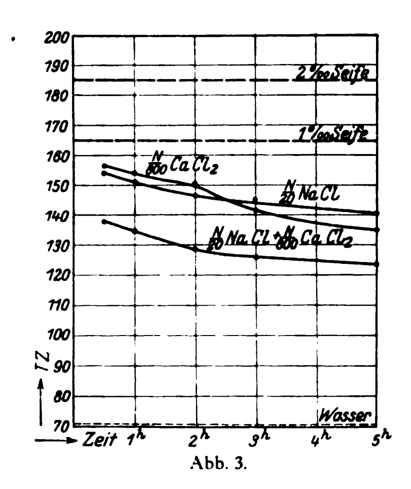


Abb. 3.

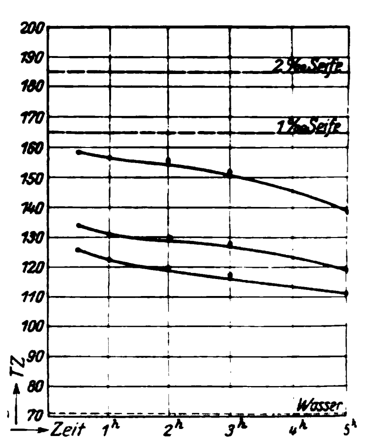


Abb. 4. Die obere Kurve $MgCl_2$; die untere Kurve $LiCl_2$; die mittlere Kurve $MgCl_2$ + $LiCl_2$.

Tabelle IV.

Konzentration	Zeit 30 Min.	1 Std.	2 Std.	3 Std.	5 Std.
n/20 NaCl	154	151	145	145	142
n/800 $CaCl_2$	156	154	150	142	135
n/20 NaCl + n/800 $CaCl_2$	134	135	128	126	123

Tabelle V.

Konzentration	Zeit 30 Min.	1 Std.	2 Std.	3 Std.	5 Std.
n/20 LiCl	125	122	120	118	112
n/120 $MgCl_2$	159	157	155	152	139
n/20 LiCl + n/1200 $MgCl_2$	134	131	130	129	119

Aus diesen Versuchen sieht man, daß es kaum möglich ist, die wirklich definitive Oberflächenspannung einer salzhaltigen Seifenlösung anzugeben, weil die zeitliche Änderung sehr lange andauert.

Aber immerhin kommt man bei der Vergleichung verschiedener Salzarten zu einem brauchbaren Wert, wenn man auf den definitiven Wert überhaupt verzichtet und in allen Fällen die Messung 1 Stunde nach Zusatz

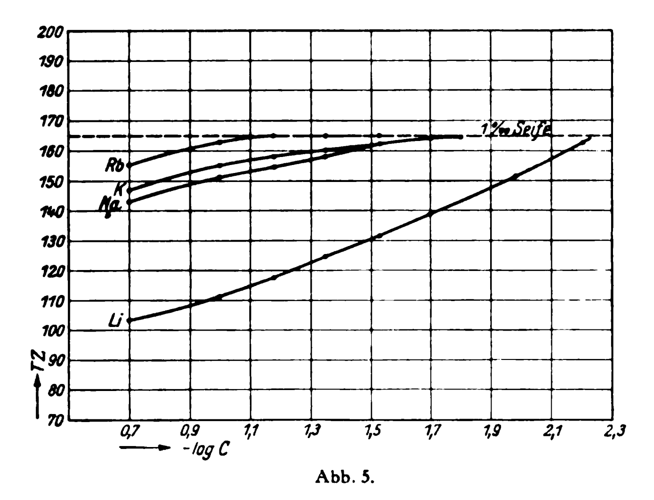


Abb. 5.

des Salzes vornimmt. Die Kurve verläuft hier in allen Fällen ziemlich flach, so daß es auf kleine Zeitdifferenzen dann nicht ankommt. Diese Methode wählte ich für die folgenden Versuche, bei denen es sich darum handelt, die Wirkung verschiedener Salze miteinander zu vergleichen.

Die Wirkung der einzelnen Salze

In Abb. 5 und Tabelle VI ist die nach dem soeben entwickelten Grundsatz gemssenee Wirkung der Chloride von Li, Na, K und Rb für verschiedene Konzentrationen dargestellt. Man erkennt deutlich die Zunahme der Wirkung in der Reihe des abnehmenden Atomgewichtes, und besonders stark unterscheidet sich die des Li von den übrigen. Der entsprechende Versuch für verschiedene zweiwertige Kationen und das dreiwertige Al ist in Abb. 6 und Tabelle VII dargestellt. Die Wirkung der zweiwertigen Ionen ist überall viel stärker, eine bestimmte Reihenfolge

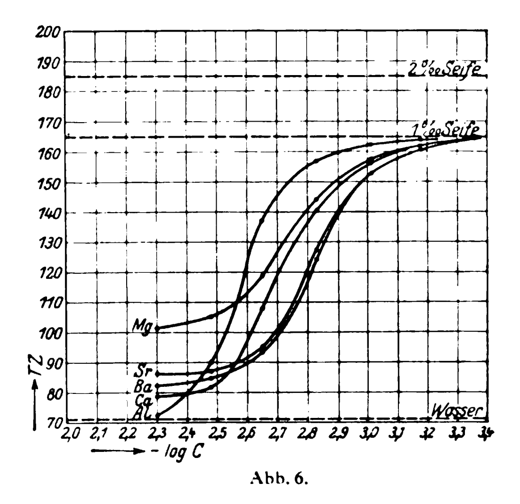


Abb. 6.

Tabelle VI.

— log c	Rb	K	Na	Li
0,70	155	147	143	103
1,00	163	155	151	111
1,18	164	158	154	118
1,35	166	160	158	125
1,53	165	162	162	131
1,70	164	164	164	140
1,98	—	—	—	151
2,20	—	—	—	163

Tabelle VII.

— log c	Mg	Ca	Sr	Ba	Al
2,30	101	79	86	82	72
2,48	105	81	87	85	90
2,65	119	108	95	94	133
2,83	144	140	128	126	157
3,01	158	156	153	153	163
3,18	162	161	161	161	165
3,36	164	164	165	164	165

ist nicht sicher anzugeben, weil die Kurven sich zum Teil überschneiden. Insbesondere gilt dies für Al, welches in niederen Konzentrationen schwächer, aber in höheren Konzentrationen stärker wirkt als die zweiwertigen Ionen. Es ist möglich, daß diese Tatsache darauf zurückzuführen ist, daß unsere Art der Darstellung in den Diagrammen nicht die zweckmäßigste ist. Da es sich um ein Gleichgewicht oder doch jedenfalls um ein Quasigleichgewicht des Systems handelt, ist es eigentlich nicht richtig, daß man die gesamte Konzentration der Ionen auf der Abszisse aufträgt. Ein Teil dieser Ionen ist in den Micellen der Seife gebunden und nur ein Teil frei gelöst. Es wäre daher zweckmäßiger, die Konzentration der *freien* Ionen als Abszisse zu benutzen. Da aber die adsorbierte Menge der Ionen kaum bestimmt werden kann, so muß man auf eine derartige, rationelle Darstellung verzichten. Bei den einwertigen Ionen, welche wenig adsorbiert werden, fiel dieser Umstand wenig ins Gewicht, aber hier bei den mehrwertigen Ionen, welche stärker adsorbiert werden, werden die Verhältnisse sicherlich stark geändert. Zweifellos ist es dadurch zu erklären, daß das dreiwertige Al in niederen Konzentrationen so schwach wirkt. Die Konzentration der freien Al-Ionen ist bei dem sehr stark adsorbierbaren Al zweifellos viel geringer als die der freien Ca-Ionen bei gleicher Gesamtkonzentration. Bei hohen Salzkonzentrationen, wo die prozentische Adsorption nicht so sehr ins Gewicht fällt, zeigt sich auch sofort die Überlegenheit des Al gegenüber den zweiwertigen Ionen. Aber auch wenn man diese Umstände berück-

sichtigt, bleibt immer noch die auffällige Tatsache bestehen, daß in hohen Konzentrationen das Ca nicht an der richtigen Stelle in der Atomgewichtsreihe der zweiwertigen Ionen steht. Dagegen zeigt sich diese Reihe in richtiger Weise bei etwas niederen Gesamtkonzentrationen, ziwschen n/300 und n/1000.

Wirkungen von Salzgemischen.

In Tabelle VIII und Abb. 7 ist die Wirkung eines Gemisches von n/20 NaCl und variierten Mengen von $CaCl_2$ dargestellt. Der Versuch ist leicht verständlich. Es zeigt sich überall eine Summierung der Wirkung, von Antagonismus ist nichts zu erkennen. Dies ist aber anders bei einem Gemisch von LiCl und $MgCl_2$. In den folgenden drei Protokollen (Tabelle IX) und Diagramm 8, 9 und 10 sind solche Versuche dargestellt. Innerhalb jeder Versuchsreihe ist die Menge des LiCl auf je einem bestimmten Wert konstant gehalten, während die Menge des $MgCl_2$ variiert wird. Die obere gestrichelte horizontale Linie zeigt die Oberflächenspannung der salzfreien Seife, die untere die der nur mit LiCl versetzten Seife. Eine antagonistische Wirkung würde sich dadurch auf der Kurve bemerkbar machen, daß die Kurve für das Salzgemisch die untere horizontale Linie übersteigen muß; dies ist in der Tat in allen drei Fällen zutreffend. Man erkennt, daß der Antagonismus am stärksten

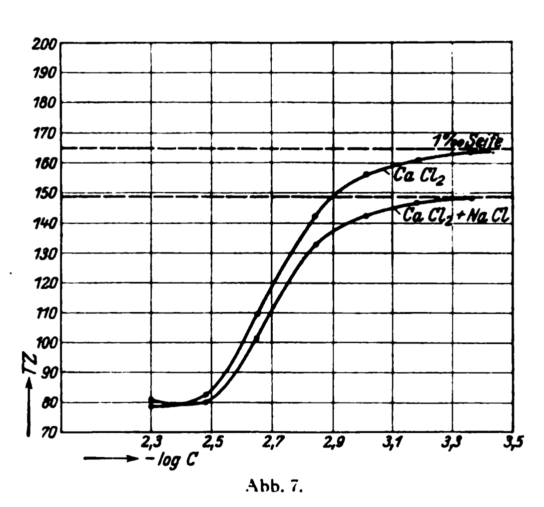


Abb. 7.

Tabelle VIII.

$CaCl_2$ (— log c) c bedeutet Äquivalentkonzentration	NaCl (norm.)	Tropfenzahl des Gemisches	Tropfenzahl mit $CaCl_2$ allein
2,30	0,05	82	78
2,48	0,05	80	83
2,65	0,05	102	110
2,83	0,05	132	143
3,01	0,05	141	156
3,18	0,05	148	161
3,36	0,05	150	163

Tabelle IX.

$MgCl_2$ (— log *c*)	$MgCl_2$ + n/32 Li		$MgCl_2$ + n/20 Li		$MgCl_2$ + n/8 Li		$MgCl_2$
2,30	103	siehe Abb. 8	100	siehe Abb. 9	97	siehe Abb. 10	101
2,48	104		104		100		106
2,65	106		113		102		119
2,83	132		130		120		144
2,90	139		136		117		—
3,01	142		134		114		158
3,18	135		130		110		162
3,36	132		125		108		164

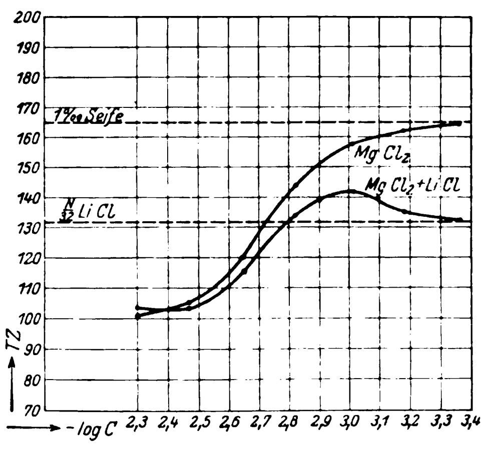


Abb. 8.

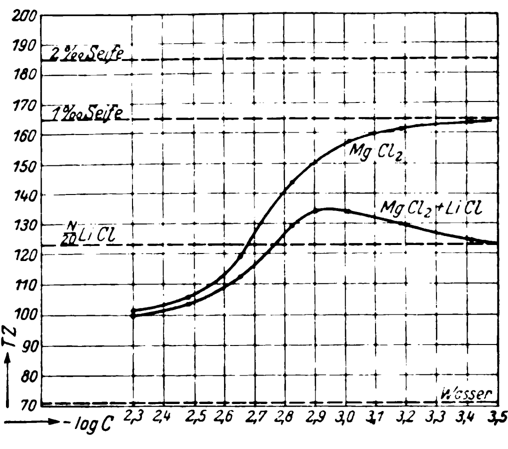


Abb. 9.

für ein gewisses Mengenverhältnis zwischen Li und Mg ausgebildet ist; es beträgt in einer n/8 LiCl-Lösung 83 : 1, für n/20 LiCl 40 : 1, für n/32 LiCl 31 : 1.

Tabelle X und Abb. 11 zeigen einen gleichen Versuch für das Gemisch $CaCl_2$ und LiCl. Hier ist von einem Antagonismus nichts zu merken; die spurweise Erhebung der Mischungskurve über die Horizontale für LiCl fällt wohl in die Versuchsfehler. Das gleiche gilt für die Versuche mit $SrCl_2$ und LiCl. Dagegen ist wieder ein deutlicher Antagonismus zu bemerken bei dem Gemisch $BaCl_2$ und LiCl. Das Optimum desselben liegt bei dem Mischungsverhältnis Li : Ba = 50 : 1 (Fig. 13). Zusammenfassend können wir sagen, daß in einigen Fällen ein deutlicher Antagonismus zwischen einwertigen und zweiwertigen Ionen zu bemerken ist, in anderen Fällen nicht. Die günstigsten Kombinationen sind Mg—Li und Ba—Li, dieselben, bei denen auch *Freundlich* und *Scholtz* Anta-

Tabelle X.

$CaCl_2$ (— log c)	$CaCl_2$ + n/20 LiCl	$CaCl_2$ allein	$CaCl_2$ (— log c)	$CaCl_2$ + n/20 LiCl	$CaCl_2$ allein
2,30	82	78	3,01	122	156
2,48	85	83	3,18	123	163
2,65	100	108	3,36	123	164
1,83	125	140			

Tabelle XI.

$SrCl_2$ (— log c)	$SrCl_2$ + n/20 LiCl	$SrCl_2$ allein	$SrCl_2$ (— log c)	$SrCl_2$ + n/20 LiCl	$SrCl_2$ allein
2,30	88	86	3,01	123	145
2,48	91	87	3,18	124	159
2,65	101	96	3,36	123	164
2,83	124	126			

Tabelle XII.

$BaCl_2$ (— log c)	$BaCl_2$ + n/20 LiCl	$BaCl_2$ allein	$BaCl_2$ (— log c)	$BaCl_2$ + n/20 LiCl	$BaCl_2$ allein
2,30	98	82	3,01	123	153
2,48	92	85	3,18	121	162
2,65	102	95	3,36	120	164
2,83	143	125			

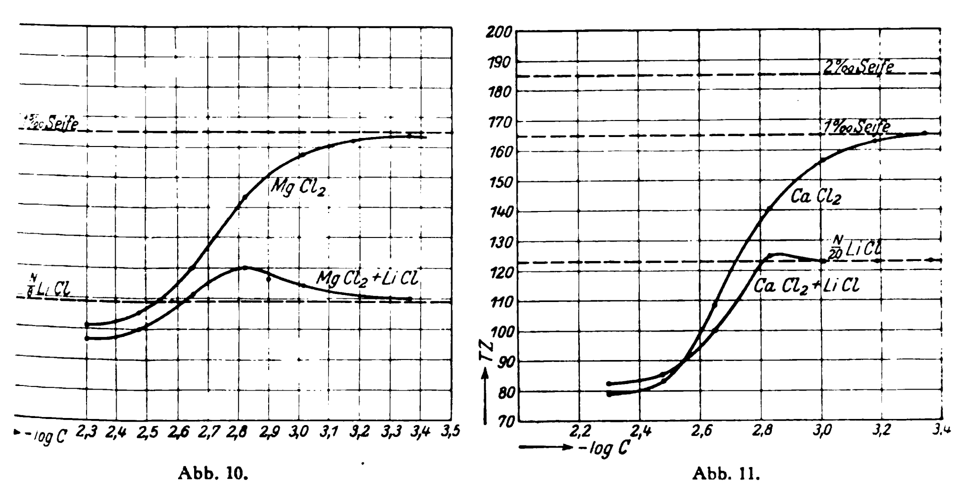


Abb. 10. Abb. 11.

gonismus beim Schwefelsol fanden, während die physiologisch so wirksame Kombination Na—Ca hier keinen Antagonismus erkennen läßt.

Die Trübung der Seifenlösung.

Als zweite kolloidale Eigenschaft der Seifenlösung wurde die Trübung untersucht. Am einfachsten wäre es, die Schwellenkonzentration der Elektrolyte aufzusuchen, welche eben eine sichtbare Flockung erzeugt, wie es z. B. *Freundlich* und *Scholtz* beim Schwefelsol getan

haben. Aber bei der Seife ist diese Methode unbrauchbar, weil es keine auch nur einigermaßen scharfe Schwellenkonzentration gibt. Die Übergänge sind viel zu allmählich. Deshalb nehmen wir den Trübungsgrad als Maßstab. Der Antagonismus zwischen Li und Ca macht sich hier deutlich dadurch bemerkbar, daß die Trübung, welche Li Cl erzeugt, durch Ca aufgehellt wird. Freilich ist es sehr schwer, diese Änderung zahlenmäßig anzugeben. Zum Glück ist die Änderung aber so bedeutend, daß eine bloße qualitative Beschreibung zu einem überzeugenden Resultat führt. Man könnte meinen, daß man zu einer zahlenmäßigen Angabe auf folgende Weise gelangen könne: Man versetzt die Seifenlösung mit absteigenden Mengen Li und bestimmt, in welcher Li-

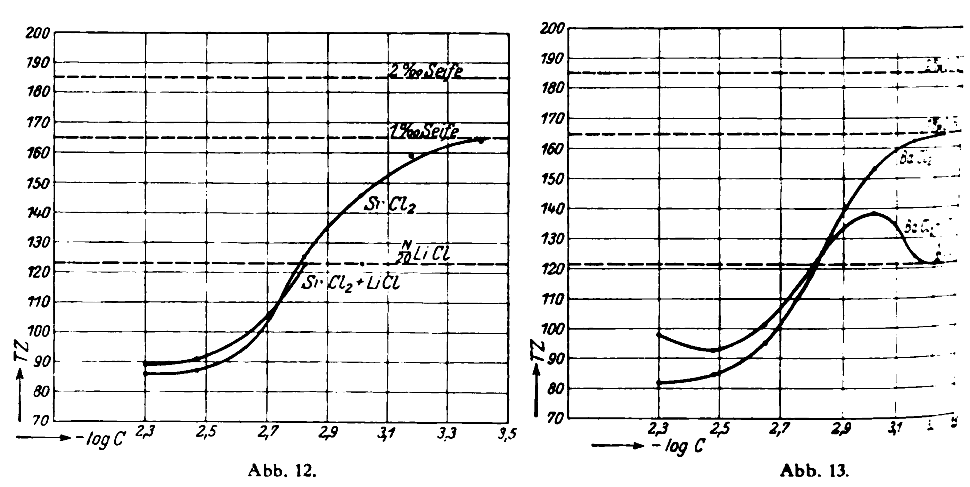


Abb. 12. Abb. 13.

Konzentration die Trübung gleich ist der Trübung der höheren Li-Konzentration bei gleichzeitiger Gegenwart von Ca. Das ist aber nicht möglich. Die Trübung wird nämlich nicht nur quantitativ, sondern auch in hohem Maße qualitativ geändert. Eine Trübung durch LiCl allein ist in allen Konzentrationen, wenn sie auch noch so geringfügig zu sein scheint, stets relativ grobkörnig, und die antagonistische Wirkung des Ca besteht darin, daß sie homogener und durchscheinender wird. Die Li-Trübung „deckt" immer sehr stark, selbst wenn sie dünn ist, die Trübung des Gemisches deckt wenig, selbst wenn sie beim ersten Anblick sehr dick erscheint; trotz starken Tyndallkegels bei seitlicher Beleuchtung ist sie immer gut durchscheinend. Ein solcher Versuch über die antagonistische Wirkung bei der Trübung ist daher ein frappierender und beim Anblick sofort überzeugender Versuch, aber er läßt sich sehr schwer protokollieren. Wir machen den Versuch einer solchen Protokollierung auf folgende Weise. In den Tabellen bedeutet die Zahl der Kreuze die roh geschätzte Stärke der Trübung überhaupt. Unter

den Kreuzen befinden sich entweder *Punkte*, das soll bedeuten: „Grobkörnigkeit"; oder eine *Wellenlinie* mit der Bedeutung: „gute Transparenz". Aber immerhin gibt diese Art der Protokollierung nur einen schwachen Eindruck von dieser auffälligen, geradezu *für einen Vorlesungsversuch* geeigneten Erscheinung. Die folgenden Tabellen zeigen Versuche mit LiCl einerseits und einigen zweiwertigen Ionen andererseits. Wir können hinzufügen, daß ein geringer, aber auf diese Weise schwer protokollierbarer Antagonismus auch für Na und Ca gezeigt werden kann.

Tabelle XIII.

LiCl.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
LiCl (— log *c*)	1,3 ++++ · · · ·	1,6 ++++ · · · ·	1,9 ++++ · · · ·	2,2 ++++ · · · ·	2,5 +++ · · ·	2,8 ++ · ·	3,1 + ·	3,4 0	3,7 0

	1	2	3	4	5	6
			$MgCl_2$.			
$MgCl_2$ (— log *c*)	2,30 Flockung	2,48 ++++ · · · ·	2,65 +++ ∼∼∼	2,83 ++ ∼∼	3,01 + ∼	3,18 ± ∼
			$MgCl_2$ + LiCl.			
$MgCl_2$ (— log *c*) LiCl (— log *c*)	2,30 1,3 +++ ∼∼∼	2,48 1,3 + ∼	2,65 1,3 +	2,83 1,3 ± ∼	3,01 1,3 +++ · · ·	3,18 1,3 ++++ · · · ·

Tabelle XIV.

	1	2	3	4	5	6
			$CaCl_2$.			
$CaCl_2$ (— log *c*)	2,30 ++ · ·	2,48 ++ · ·	2,65 + ·	2,83 0	3,01 0	3,18 0
			$CaCl_2$ + LiCl.			
$CaCl_2$ (— log *c*) LiCl (— log *c*)	2,30 1,3 +++ ∼∼∼	2,48 1,3 + ·	2,65 1,3 ±	2,83 1,3 + ·	3,01 1,3 ++ · ·	3,18 1,3 +++ · · ·

Tabelle XV.

	1	2	3	4	5	6
			$SrCl_2$.			
$SrCl_2$ (— log *c*)	2,30 ++++ · · · ·	2,48 +++ · · ·	2,65 ++ · ·	2,83 + ·	3,01 0	3,18 0
			$SrCl_2$ + LiCl.			
$SrCl_2$ (— log *c*) LiCl (— log *c*)	2,30 1,3 ++++ · · · ·	2,48 1,3 +++ · · ·	2,65 1,3 ± ·	2,83 1,3 ++ · ·	3,01 1,3 +++ · · ·	3,18 1,3 +++ · · ·

Tabelle XVI.

	1	2	3	4	5	6
			$BaCl_2$.			
$BaCl_2$ (— log *c*)	2,30	2,48	2,65	2,83	3,01	3,18
	++++	+++	+++	+	+	0
	. . . .	. . .	. . .	.	.	
			$BaCl_2$ + LiCl.			
$BaCl_2$ (— log *c*)	2,30	2,48	2,65	2,83	3,01	3,18
LiCl (— log *c*)	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3	1,3
	+++++	++++	++	++	+	++
	. . . . .	. . . .	. .	. .	.	. .

Die Anwendung des Wortes Antagonismus ist in diesen Fällen nur mit Reserve erlaubt, denn es handelt sich nicht darum, daß das Ca die Wirkung des Li zum Teil einfach aufhebt, sondern es wird ein ganz neuer kolloidaler Zustand geschaffen, eine völlige Änderung des Dispersionszustandes des Kolloids. Das ist aber eine Tatsache, die der biologischen Seite der Sache ein Interesse abgewinnen hilft. Denn auch in den biologischen Fällen kann man ja nicht die Wirkung eines Gemisches von Na und Ca gleichwertig mit der von destilliertem Wasser oder isotonischer Zuckerlösung setzen, sondern es entsteht durch die Mischung der Ionen ein durchaus *neuer* Zustand. Von den bisher beschriebenen Modellen der sogenannten antagonistischen Wirkung kommt keines den biologischen Fällen des „Antagonismus" so nahe wie der Einfluß der Salzgemische auf den Dispersionszustand der Seifenlösung. Man darf daher wohl vermuten, daß die Beeinflussung des *Dispersions*zustandes der Zellkolloide das wesentliche Moment bei der physiologischen Wirkung der Salzgemische ist, wobei dieser Zustand nicht allein zu definieren ist nach der *Größe* der suspendierten Micellen überhaupt, sondern nach ihrer Feinstruktur, nach dem Grade, in welchem kleinere Micellen entweder selbständig bleiben oder zu gröberen sekundären Micellen verbunden sind.

Der wesentlichste Befund dieser Arbeit ist also, daß der relativ grobkörnige Zustand, den ein einwertiges Kation, besonders Li, in einer Seifenlösung erzeugt, durch sehr geringe Mengen Ca oder besser Mg in einen sehr feinkörnigen Zustand umgewandelt ist, und daß dieser Zustand der Feinkörnigkeit nur durch den Zusatz einer gewissen Menge Mg oder ähnlicher Ionen erreicht werden kann, nicht aber durch einfache Verminderung der Li-Menge ohne Mg-Zusatz.

Der Verwendungsstoffwechsel säurefester Bakterien.

V. Mitteilung:

Über den quantitativen Verwendungsstoffwechsel des Timotheebazillus und des Trompetenbazillus.

Von

H. Wolff.

(Aus der bakteriologisch-hygienischen Abteilung des Städtischen Hygienischen Universitätsinstituts zu Frankfurt a. M.)

(Eingegangen am 16. März 1925.)

Mit 8 Abbildungen im Text.

In den vorhergehenden Mitteilungen in dieser Zeitschrift[1]) ist über den Verwendungsstoffwechsel der Typhus-, Paratyphus-A- und -B-Bazillen, der Koli-, Ruhrbakterien und der einzelnen Arten der säurefesten Mikroorganismen berichtet worden.

Es wurde in den bisherigen Untersuchungen über den Verwendungsstoffwechsel in erster Linie der *qualitativen* Seite Rechnung getragen. Es fehlten systematische Untersuchungen über die notwendige *Quantität* der unentbehrlichen Stoffe. Diese Frage ist natürlich ebenfalls von Bedeutung.

Auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. *Braun* habe ich zunächst den quantitativen Verwendungsstoffwechsel der saprophytischen säurefesten Bakterien untersucht. Wir wählten hierzu den Timothee- und den Trompetenbazillus.

Auf die Besprechung von Fragen, für deren Lösung die Kenntnis des quantitativen Verwendungsstoffwechsels von Bedeutung ist, werden wir bei Behandlung der Versuche eingehen. Bevor wir jedoch zur Wiedergabe der Versuche übergehen, sind einige Ausführungen über die bei der Arbeit angewandte Methodik und Versuchstechnik notwendig. Diese baut sich auf die in den früheren Mitteilungen beschriebene auf. Wir dürfen auf die entsprechenden Veröffentlichungen verweisen.

[1]) Diese Zeitschr. **131**, **145**, **146**, **155**; Klin. Wochenschr. **3**, 1924.

Zur Prüfung des quantitativen Verwendungsstoffwechsels der säurefesten Bakterien gingen wir von der *Acetat-Ammoniaknährlösung* aus, die nach unseren früheren Erfahrungen den säurefesten Bakterien gutes Wachstum ermöglicht. Diese Nährlösung hat folgende Zusammensetzung:

Ammoniumsulfat	0,5	Proz.
Magnesiumsulfat	0,005	„
Kaliumphosphatgemisch [1 Teil primäres + 3 Teile sekundäres (= Puffergemisch)] .	0,2	„
Natriumacetat	0,5	„

Die *quantitativen Untersuchungen* haben wir nach gewichts- und maßanalytischen Prinzipien durchgeführt. Es sollte untersucht werden, wo für den Timotheebazillus bei jedem Element das *Vermehrungsminimum* liegt, d. h. welche kleinste Menge des betreffenden Elementes eben noch zur Unterhaltung des Wachstums ausreicht, und wo das *Vermehrungsoptimum* sich befindet.

Wir gingen daher so vor, daß wir von den in der Acetat-Ammoniaknährlösung enthaltenen sieben Elementen *Magnesium, Kalium, Natrium, Schwefel, Phosphor, Stickstoff, Kohlenstoff* nacheinander immer eines fortließen und dasselbe dann quantitativ in Form von volumetrischen Lösungen wieder hinzufügten. Hinsichtlich der Konzentrationen hielten wir uns an die Dezimalstellen, so daß der untersuchte prozentuale Gehalt im allgemeinen betrug: 1, 0,1, 0,01, 0,001, 0,0001, 0,00001, 0,000001, 0,0 Proz.

Die Verdünnungen wurden hergestellt aus einer doppelt konzentrierten Acetat-Ammoniaklösung unter Fortlassung eines Elementes und aus der doppelt konzentrierten Lösung der zuzusetzenden Verbindung des fortgelassenenen Elementes, was zusammengefügt eine Lösung einfacher Konzentration ergab.

Ein Beispiel möge dies erläutern: Magnesiumsulfat wurde fortgelassen und quantitativ zugesetzt in Gestalt einer Magnesiumsulfatlösung. Wir begannen bei der Herstellung der oben angegebenen Versuchsreihe bei den stärkeren Konzentrationen, um bei den höheren Verdünnungen aufzuhören.

Lösung a (doppelt konzentriert, ohne Mg):

Ammoniumsulfat	1,0 g
Kaliumphosphatgemisch. . . .	0,4 g
Natriumacetat	1,0 g
Aqua bidest. ad volumen . . .	100 ccm

Lösung b_1: Magnesiumsulfat . . 2 Proz.

Lösung b_2 (aus b_1 5 ccm + 495 ccm H_2O):
Magnesiumsulfat . . . . 0,02 Proz.

Lösung b_3 (aus b_2 5 ccm + 495 ccm H_2O):
Magnesiumsulfat . . . . 0,0002 Proz.

Herstellung der Verdünnungen:

		Magnesiumsulfatgehalt in Proz.
50 ccm a + 50	ccm b_1	= 1
50 „ a + 5	„ b_1 + 45 ccm H_2O	= 0,1
50 „ a + 50	„ b_2	= 0,01
50 „ a + 5	„ b_2 + 45 ccm H_2O	= 0,001
50 „ a + 50	„ b_3	= 0,0001
50 „ a + 5	„ b_3 + 45 ccm H_2O	= 0,00001
50 „ a + 0,5	„ b_3 + 49,5 ccm H_2O	= 0,000001
50 „ a + 50	„ H_2O	= 0

In dieser Weise stellten wir die Verdünnungen für unsere sämtlichen quantitativen Versuchsreihen her, füllten jedesmal zwei Erlenmeyerkölbchen mit 20 ccm der betreffenden Lösung und sterilisierten 20 Minuten im Dampftopf.

Die Zusammensetzung der einzelnen Nährböden ist jedesmal bei dem dazugehörigen Versuch angegeben, wo auch kleine spezielle Ergänzungen vorstehender Versuchstechnik eingefügt wurden.

Mitunter ist an *chemische Umsetzung* der eingebrachten Substanzen zu denken, besonders, da die Nährböden im Dampf sterilisiert werden müssen. Deshalb haben wir solche Körper, die beim Erhitzen miteinander reagieren, getrennt sterilisiert und die Lösungen erst nach dem Erkalten vereinigt. Falls auch dann in der Kälte noch Ausfällungen eintraten, so mußte mit der Konzentration des betreffenden mineralischen Nährstoffs heruntergegangen werden.

Die Beimpfung der Versuchskölbchen erfolgte nicht vom Nähragar oder von Nährbouillon, sondern bereits von einer Nachzucht der Bakterien im künstlichen Nährboden, da wir auf diese Weise die Mitübertragung von Bouillonbestandteilen vermeiden wollten. Stets wurden zwei Kölbchen gleichzeitig beimpft, da man bei den säurefesten Bakterien öfter Unregelmäßigkeiten erlebt, indem von zwei gleichzeitig beimpften Kölbchen in dem einen das Wachstum ein gutes ist, in dem anderen dagegen ein kümmerliches sein kann. Mitunter bleibt es ganz aus. Worauf diese Unregelmäßigkeiten zurückzuführen sind, konnten wir nicht ergründen. Sie sind aber öfter vorhanden, so daß wir auch in den Passagen immer zwei Kölbchen gleichzeitig impften. Die Beimpfung mit dem Timotheebazillus muß so vorgenommen werden, daß die Kulturmasse an der Oberfläche der Flüssigkeit schwimmt, da sie bei Untertauchen nicht mehr anwächst.

Niemals begnügten wir uns aus den oben angeführten Gründen bei der Prüfung des quantitativen Verwendungsstoffwechsels mit dem Wachstum in einer Passage, sondern stets wurden fünf Passagen durchgeführt, abgesehen von einigen wenigen Nebenversuchen, wo wir uns auf drei Passagen beschränkten. Als erste Passage bezeichneten wir nicht die erste Überimpfung in ein neues Nährsubstrat, sondern erst die *zweite* Kultur in der zu untersuchenden Nährlösung.

Die einzelnen Versuche wurden beim Abschluß der fünften Passage auf *Reinheit* mit Hilfe von Gramfärbung, Ziehl-Neelsenfärbung und durch Züchtung auf geeigneten festen oder flüssigen bouillon- eventuell glycerinhaltigen Nährböden geprüft.

I. Quantitativer Verwendungsstoffwechsel von Magnesium-, Kalium-, Natrium-, Schwefel-, Phosphor-, Stickstoff- und Kohlenstoffverbindungen.

a) *Magnesium.*

Für säurefeste Saprophyten zeigten *Braun*, *Stamatelakis* und *Kondo*, daß ein Zusatz von Magnesium erforderlich ist. Es war deshalb notwendig, quantitative Untersuchungen auszuführen, um einiges über die zum Wachstum nötige Magnesiummenge bei säurefesten Bakterien zu erfahren.

Die Versuchsanordnung ist oben in der Versuchstechnik besprochen. Hierzu hatte die magnesiumfreie Nährlösung folgende Zusammensetzung:

Ammoniumsulfat	0,5 g	Natriumacetat	0,5 g
Kaliumphosphatgemisch .	0,2 g	Aqua bidest. ad volumen .	100 ccm

Die quantitativ zugesetzte Magnesiumlösung bestand aus Magnesiumsulfat.

Wir fanden, daß für das Gedeihen des Timotheebazillus das Magnesium einen lebenswichtigen Bestandteil darstellt, ohne den kein Wachstum in Passagen stattfand. Wohl wuchs der Timotheebazillus in einem Nährboden ohne Magnesium oder mit minimalen Spuren von Magnesiumsulfat zunächst an, es stellte sich jedoch durch die Passagen heraus, daß er hier nicht dauernd züchtbar ist, denn bereits in der ersten Passage zeigte sich keine Vermehrung mehr. Diese Ergebnisse wurden durch wiederholte Versuche gewonnen.

Die niedrigste Magnesiumsulfatkonzentration, bei der wir Wachstum erzielten, lag bei 0,001 Proz., so daß sich also das Wachstumsminimum in der Nähe von 0,001 Proz. nach unten befindet. Bei 0,0001 Proz. wuchs dieser Stamm noch in der ersten Passage, von der zweiten ab gedieh er nicht weiter. Zwischen 0,001 und 0,0001 Proz. liegt also das *Wachstumsminimum.*

Bei einem Gehalt von 0,001 Proz. Magnesiumsulfat war es erstmalig möglich, fünf Passagen durchzuführen, doch war für dieselben ein längerer Zeitraum erforderlich wie bei der Anwesenheit einer größeren Magnesiummenge. Erst von 0,01 Proz. ab gestaltete sich das Wachstum regelmäßig und kräftig.

Das *Optimum* ist nicht genau festlegbar, denn bei Anwesenheit stärkerer Magnesiummengen ist die Fortentwicklung überall gut. Das Optimum nimmt also eine breitere Spanne ein und dürfte etwa den Magnesiumsulfatgehalt 0,01 Proz. und darüber umfassen. Hier erschweren jedoch von 0,1 Proz. ab auftretende Magnesiumniederschläge in der verwendeten Nährlösung das Arbeiten. Um dies zu umgehen, empfiehlt sich getrennte Sterilisation der Lösungen, d. h. der magnesiumfreien Stammlösung und der zuzusetzenden Magnesiumsulfatlösung, und erst eine spätere Vereinigung der erkalteten Lösungen mit sterilen

Pipetten. Auch darf man die p_H 7,1 nicht nach der alkalischen Seite überschreiten. Auf diese Weise gingen wir noch zur Untersuchung einer höheren Konzentration wie 1 Proz. über, und zwar stellten wir einen Nährboden mit 2,5 Proz. Magnesiumsulfat her. Hier erwies sich das Wachstum während sämtlicher Passagen hinsichtlich der Stärke des Häutchens als recht kräftig, schien aber in bezug auf seine lokale Ausdehnung bereits wieder abzunehmen. Es fiel uns hier auf, daß sich infolge des hohen Magnesiumsulfatgehaltes im Laufe der Zeit an der Unterseite der gewachsenen Häutchen mehr oder weniger große Kristalle absetzten.

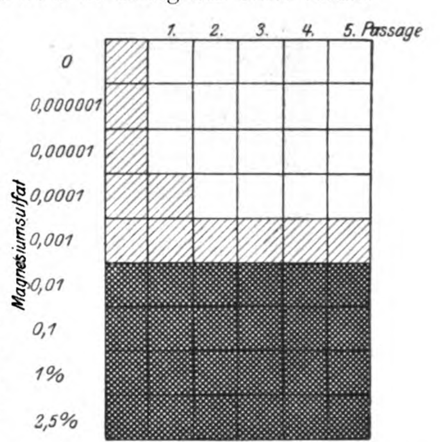


Abb. 1. Magnesium beim Timotheebazillus.

Zeichenerklärung:

Wachstum:

kein Wachstum,

mäßig,

gut,

sehr gut.

b) Kalium.

Wie steht es nun mit der Frage der Kaliumnotwendigkeit bei den säurefesten Bakterien? In der Arbeit von *H. Braun* und *Kondo* über den Verwendungsstoffwechsel des Tuberkelbazillus[1]) ist in Übereinstimmung mit *Lockemann* ein wachstumsbegünstigender Einfluß dieses Elementes für den *Tuberkelbazillus* hervorgehoben worden. Dagegen war bei den säurefesten Saprophyten das Kalium nicht von so großer Wichtigkeit. Diese Versuche wurden in Kölbchen aus gewöhnlichem oder Jenaer Glas ausgeführt, so daß nicht ausgeschlossen werden konnte, daß Spuren von Kalium aus dem Glas in die Nährflüssigkeit übergegangen sind. Trotzdem aber konnte die Wachstumsbegünstigung einwandfrei festgestellt werden. Es war deshalb nötig, diese Versuche unter einwandfreien Bedingungen in Bergkristallgefäßen zu wiederholen.

Die Notwendigkeit des Kaliums wurde geprüft für *den Timotheebazillus* und für den *Trompetenbazillus*. Die kaliumfreie Nährlösung setzte sich folgendermaßen zusammen:

Ammoniumsulfat	0,5 g
Magnesiumsulfat	0,005 g
Natriumphosphatgemisch	0,2 g
Natriumacetat	0,5 g
Aqua bidest. ad volumen	100 ccm

Quantitativ setzten wir Kaliumchlorid zu.

[1]) Klin. Wochenschr. **3**, 1924.

Eine Untersuchung des Timotheebazillus in *Bergkristallkölbchen* zeigte, daß er auch unter diesen Bedingungen in einer kaliumfreien Nährlösung wuchs.

Andere Ergebnisse lieferten die Versuche mit dem Trompetenbazillus, denn der Trompetenbazillus zeigte sich hinsichtlich seines Kaliumbedarfs ziemlich anspruchsvoll. Trotz Verwendung von Jenaer Glaskölbchen war es uns in wiederholten Versuchen *nicht möglich, den Trompetenbazillus in einer kaliumfreien Nährflüssigkeit zu züchten.* Auch ein Kaliumchloridgehalt von 0,00001 und 0,0001 Proz. genügte nicht, das Wachstum auf die Dauer zu unterhalten. Die niedrigste Konzentration, bei der Weitervermehrung möglich war, erreichten wir mit 0,001 Proz. Das *Wachstumsminimum* liegt also in der Nähe von 0,001 Proz. nach unten. Von hier ab aufwärts wuchs der Trompetenbazillus gut und kräftig. Unterschiede zwischen dem Wachstum bei 0,001 Proz. und demjenigen in den kaliumhaltigeren Kölbchen bis 1 Proz. waren nicht feststellbar, so daß diese Konzentrationen gleichzeitig die Bedingungen für ein optimales Wachstum boten. Da der Trompetenbazillus erheblich langsamer wächst als der Timotheebazillus, beschränkten wir uns bei der Durchführung der quantitativen Versuche in diesem Falle auf drei Passagen.

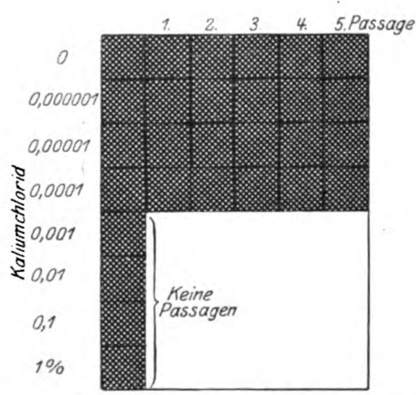


Abb. 2. Kalium beim Timotheebazillus. Zeichenerklärung siehe Abb. 1 auf Seite 323.

Abb. 3. Kalium beim Trompetenbazillus. Zeichenerklärung siehe Abb. 1 auf Seite 323.

c) Natrium.

Auf Grund der bisherigen Untersuchungen erwies sich das Natrium im Bakterienleben — soweit bekannt — als entbehrlich. Dies können wir für den Timotheebazillus bestätigen, den wir, wie dies bei den anderen Elementen geschehen, hinsichtlich seines Natriumbedarfs untersuchten. Auch im natriumfreien Nährboden war das Wachstum gut. Der natriumfreie Nährboden hatte folgende Zusammensetzung:

Ammoniumsulfat . . .	0,5 g	Kaliumacetat	0,5 g
Magnesiumsulfat	0,005 g	Aqua bidest. ad volumen.	100 ccm
Kaliumphosphatgemisch	0,2 g		

d) Schwefel.

Aus den früher mitgeteilten Versuchen mit der Typhus-Koligruppe geht hervor, daß sich diese Arten von Mikroorganismen dauernd ohne Schwefel züchten lassen. Es muß allerdings hervorgehoben werden — was auch für die Lebensnotwendigkeit anderer Elemente Gültigkeit hat —, daß die Tatsache der Züchtbarkeit von Bakterien ohne ein Element noch nicht die Notwendigkeit dieses Elementes für bestimmte Zellfunktionen ausschließt.

Welche Rolle spielt nun der Schwefel im Verwendungsstoffwechsel des Timotheebazillus?

Die Zusammensetzung der schwefelfreien Nährlösung war:

Ammoniumchlorid	0,5 g
Magnesiumchlorid	0,005 g
Kaliumphosphatgemisch	0,2 g
Natriumacetat	0,5 g
Aqua bidest. ad volumen	100 ccm

Quantitativ zugefügt wurde Natriumsulfat.

Im Verlauf unserer Untersuchung stellte es sich heraus, daß für den Timotheebazillus der Schwefel entbehrlich ist und ohne weiteres aus der Nährflüssigkeit fortgelassen werden kann, daß er aber, falls anwesend, einen wachstumsfördernden Einfluß ausübt. Dies konnten wir deutlich bei einem Vergleich des Wachstums in den stärker sulfathaltigen Nährflüssigkeiten mit demjenigen in den schwächeren Konzentrationen sehen.

Von der angewendeten Höchstkonzentration von 2,5 Proz. Natriumsulfat bis herab zu einem Gehalt von 0,001 Proz. hatten wir ein gutes Wachstum zu verzeichnen. 0,001 Proz. stellt in unserer quantitativen Versuchsreihe einen kritischen Punkt dar, indem die darunter liegenden Werte in deutlich sichtbarer Weise nicht die gleiche gute Entwicklung den Bakterien gestatteten. Schon bei 0,0001 Proz. und erst recht darunter ist das gewachsene Häutchen außerordentlich dünn und zart, im Gegensatz zu dem weißen, dicken Häutchen, wie der Timotheebazillus im schwefelhaltigen Nährboden zu wachsen pflegt.

Mit 0,000001 Proz. Natriumsulfat sowie ganz ohne Schwefel war zwar eine Züchtung durch fünf Passagen möglich, es ist aber neben der Spärlichkeit des Wachstums zu bemerken, daß in diesen Fällen zur Durchführung der fünf Passagen etwas mehr Zeit erforderlich war.

Zusammenfassend können wir bezüglich des Schwefelverbrauchs des Timotheebazillus sagen, daß es ein *Wachstumsminimum* nicht gibt, da der Stamm auch ohne Schwefel sich weiter vermehrt. Das *Wachstums-*

optimum beginnt bei einem Natriumsulfatgehalt von 0,01 Proz. Zwischen Optimum und Minimum haben wir bei 0,001 Proz. einen kritischen Punkt, unterhalb dessen das Wachstum ganz bedeutend nachläßt.

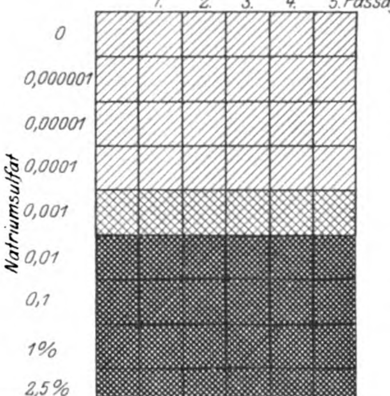


Abb. 4. Schwefel beim Timotheebazillus. Zeichenerklärung siehe Abb. 1, Seite 323.

Nebenher prüften wir die Frage ob auch der *Trompetenbazillus* in einer Nährflüssigkeit, der Schwefelverbindungen nicht zugesetzt wurden zu gedeihen vermag. Wie hinsichtlich seines Kaliumbedarfs, so erwies er sich ebenfalls hier als anspruchsvoller als der Timotheebazillus, indem er auf die Dauer in einer *schwefelfreien Nährlösung nicht wuchs.* Bereits in der zweiten Passage war das Wachstum sehr zart, das in der dritten Passage dann völlig ausblieb.

e) *Phosphor.*

Wie bei den anderen Elementen, so stellten wir uns auch hier die Aufgabe, quantitativ den Phosphorbedarf des Timotheebazillus zu untersuchen.

Die phosphorfreie Nährlösung bestand aus:

Ammoniumsulfat	0,5 g
Magnesiumsulfat	0,005 g
Kaliumchlorid	0,05 g
Natriumacetat	0,5 g
Aqua bidest. ad volumen	100 ccm

Zugefügt wurde quantitativ eine Kaliumphosphatlösung, die ein Gewichtsteil primäres und drei Gewichtsteile sekundäres Kaliumphosphat enthielt. Wenn also im folgenden von einem prozentualen Phosphatgehalt die Rede ist, so ist zu berücksichtigen, daß sich die jeweils angeführte Quantität, wie angegeben, aus primärem und sekundärem Phosphat zusammensetzt.

Zunächst konnten wir feststellen, daß der Timotheebazillus in einem phosphorfreien Nährsubstrat nicht züchtbar ist. Auch ein Phosphatgehalt von 0,000001 und 0,00001 Proz. genügte nicht, den Phosphorbedarf zu decken. Die niedrigste Konzentration, die Wachstum in Passagen gestattete, lag bei 0,0001 Proz. Eine Versuchswiederholung bestätigte dieses Resultat, so daß sich also das *Wachstumsminimum* in der Nähe von 0,0001 Proz. nach unten zu befindet. Zwar war hier das Wachstum recht spärlich und zart, aber immerhin genügte die kleine Menge von $^1/_{10000}$ Proz., um den Timotheebazillus in Passagen

zu züchten. Bei einem Phosphatgehalt von 0,001 und 0,01 Proz. verstärkte sich das Wachstum, um von 0,1 Proz. ab das Optimum zu erreichen.

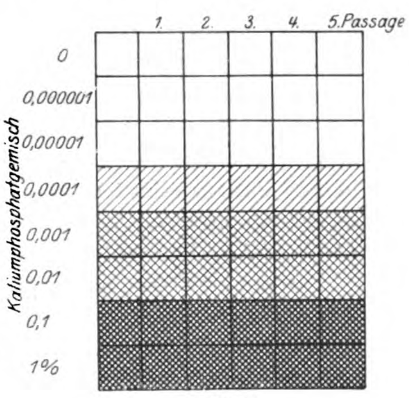


Abb. 5.
Phosphor beim Timotheebazillus. Zeichenerklärung siehe Abb. 1 auf Seite 323.

f) Stickstoff.

Wir untersuchten im folgenden das Stickstoffbedürfnis des Timotheebazillus quantitativ und benutzten als zugesetzte Substanz Ammoniumchlorid, also eine ganz einfache Verbindung. Dies hatte seinen Grund darin, daß wir vermeiden wollten, bei Verwendung einer organischen Stickstoffverbindung gleichzeitig eine zweite Kohlenstoffquelle zur Verfügung zu stellen. In diesem Falle wäre nämlich bei der quantitativen Variation der Stickstoffkomponente gleichzeitig auch ständig der Kohlenstoffgehalt und damit die Energiequelle verändert worden, so daß die Exaktheit der Untersuchung hätte leiden müssen. Dies umgingen wir durch Darreichung von *Ammoniumchlorid.*

Die verwendete stickstofffreie Nährlösung bestand aus:

Magnesiumsulfat	0,05 g	Natriumacetat	0,5 g
Kaliumphosphatgemisch .	0,2 g	Aqua bidest. ad volume .	100 ccm

Im Verlauf der angestellten Versuche fanden wir, daß etwa bei 0,1 Proz. Ammoniumchlorid und darüber das *Wachstumsoptimum* liegt, was schnelles und kräftiges Wachstum anbelangt. Darüber hinaus zeigten auch 2,5 Proz. eine sehr gute Entwicklung des gewachsenen Häutchens, wir hatten aber den Eindruck, daß die lokale Ausdehnung desselben abnahm.

Gingen wir bei der Untersuchung zu schwächeren Konzentrationen als 0,1 Proz. über, so fanden wir, daß 0,01 Proz. der niedrigste Gehalt an Ammoniumchlorid ist, der noch ein Wachstum gestattet, das als gutes bezeichnet werden konnte. Von hier ab nach unten zu begannen die Schwierigkeiten, den Timotheebazillus in Passagen zu züchten. 0,001 Proz. genügten noch zur Durchführung von fünf Passagen, jedoch setzte die Vermehrung in den frisch beimpften Kölbchen jedesmal erst nach längerer Bebrütung ein, als sie sonst nötig war, so daß für die fünf Passagen bereits erheblich mehr Zeit erforderlich war. Auch erwiesen sich des öfteren innerhalb der Passagen Versuchswiederholungen als notwendig, da der Timotheebazillus bei der ersten Überimpfung nicht anwuchs und die betreffende Passage abzureißen drohte.

Von 0,0001 Proz. Ammoniumchlorid ab wurde es noch schwieriger, den Stamm auf die Dauer zu züchten, und hörte sein Wachstum hier in der vierten Passage, bei 0,00001 und bei 0,000001 Proz. in der dritten Passage auf. Trotz Versuchswiederholung in der betreffenden Passage war es nicht möglich, weitere Kulturen zu erzielen.

In Übereinstimmung mit den früher veröffentlichten Ergebnissen gelang es uns, den Timotheebazillus auf der *stickstofffreien* Flüssigkeit in *fünf Passagen* zu züchten. Hierzu war allerdings die Dauer eines halben Jahres erforderlich. Das gebildete Häutchen war äußerst zart und dünn und war bei Betrachtung der Kölbchen von unten nur als ein Schleier sichtbar.

Besondere Versuche zeigten uns, daß *das Wachstum in stickstofffreier Nährlösung ausblieb, wenn die Kölbchen zuparaffiniert wurden und so der weitere Zufluß der Brutschrankluft unmöglich war.* Die Spuren stickstoffhaltiger Substanzen in der im Kölbchen eingeschlossenen Luft genügen also nicht mehr, Wachstum hervorzurufen. Es ist nicht Sauerstoffmangel, der das Wachstum verhindert, denn in zuparaffinierten Kölbchen, die eine *Acetat-Ammoniaknährlösung* enthalten, ist *gutes* Wachstum feststellbar. Diese Ergebnisse sind ein Beweis dafür, daß die von *Braun* und seinen Mitarbeitern früher ausgesprochene Vermutung, Verunreinigungen der Brutschrankluft würden bei Luftzutritt im stickstofffreien Nährboden als Stickstoffquellen benutzt, auf Richtigkeit beruht.

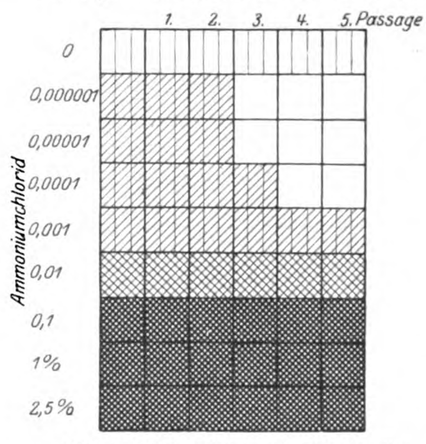


Abb. 6. Stickstoff beim Timotheebazillus.

Zeichenerklärung: Stickstoff der Brutschrankluft verwertet.
Übrige Zeichenerklärung siehe Abb. 1 auf S. 323.

g) Kohlenstoff.

Der Kohlenstoff macht den größten Teil der organischen Substanz aus, und daraus ergibt sich ohne weiteres, daß dieses Element im Verwendungsstoffwechsel der Bakterien eine erhebliche Rolle spielt.

Zur Durchführung unserer quantitativen Untersuchung über den Kohlenstoffstoffwechsel des Timotheebazillus wählten wir eine einfache organische Verbindung aus, nämlich das Natriumsalz der Essigsäure.

Die Zusammensetzung der kohlenstofffreien Nährlösung war:

Ammoniumsulfat	0,5 g	Natriumchlorid	0,5 g
Magnesiumsulfat	0,005 g	Aqua bidest. ad volumen .	100 ccm
Kaliumphosphatgemisch .	0,2 g		

Quantitativ zugefügt wurde Natriumacetat.

Die Prüfungen über die zum *Wachstumsminimum* notwendige Natriumacetatmenge zeigten in Übereinstimmung mit früher gemachten Erfahrungen als Ergebnis, daß wir den Timotheebazillus auch in der *kohlenstofffreien* Nährlösung durch fünf Passagen züchten konnten. Da der Timotheebazillus zum Aufbau seiner organischen Bestandteile Kohlenstoff natürlich unbedingt notwendig hat, kann dieses Ergebnis nur dadurch erklärt werden, daß der Stamm mit den in der Brutschrankluft enthaltenen kohlenstoffhaltigen Verunreinigungen auszukommen vermag. Diese Annahme ist um so wahrscheinlicher, als *Söhngen* nachwies, daß die säurefesten Saprophyten das der Luft versuchsweise in gasförmiger Form beigemischte Benzin oder Petroleum als Kohlenstoff- und Energiequelle verwerten können.

Das Wachstum in der Nährlösung, der wir keinen Kohlenstoff zugegeben hatten, erfolgte in einem Häutchen, das als *äußerst dünn und zart* zu bezeichnen war. Hingegen war die lokale Ausdehnung desselben gut, da es fast in jeder Passage die gesamte Oberfläche der Flüssigkeit überspannte. Wurden die Kölbchen zuparaffiniert, so blieb, wenn die Luft rein war, das Wachstum aus. Die im Kölbchen eingeschlossene Sauerstoffmenge genügt, wie Kontrollversuche im Acetat-Ammoniaknährboden zeigten, zum Wachstum. Die Vermehrung im kohlenstofffreien Nährboden bei Luftzutritt kann daher nur auf die Verunreinigungen der Brutschrankluft zurückgeführt werden.

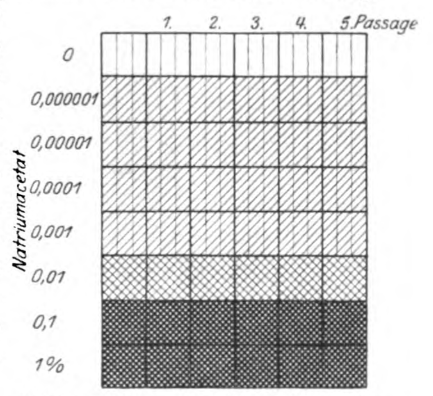


Abb. 7. Kohlenstoff beim Timotheebazillus.

Zeichenerklärung: Kohlenstoff der Brutschrankluft verwertet.
Übrige Zeichenerklärung siehe Abb. 1 auf S. 323.

Bei der Prüfung auf seinen Kohlenstoffbedarf erwies sich der Timotheebazillus als ziemlich anspruchsvoll. Zwar schien es uns so, als ob kleinste Mengen Natriumacetat, wie 0,000001 und 0,00001 Proz., eine unbedeutende Förderung des Wachstums hervorriefen, aber die Ausbildung des gewachsenen Häutchens war immer noch als spärlich zu bezeichnen, wie auch die Konzentrationen 0,0001 und 0,001 Proz. keine bemerkenswerte Besserung hervorriefen. Ein Wachstum, das als annähernd gutes bezeichnet werden kann, erreichten wir erst mit $^{1}/_{100}$ Proz. Natriumacetat. Das *Wachstumsoptimum* umfaßt den Gehalt von 0,1 Proz. des essigsauren Salzes und darüber.

Zusammenfassend wiederholen wir, daß wir ein *Wachstumsminimum* bezüglich des Natriumacetats nicht feststellen konnten, daß das *Optimum* bei 0,1 Proz. und darüber liegt, und daß zur

Erzielung eines annähernd kräftigen Wachstums $^{1}/_{100}$ Proz. Natrium-acetat erforderlich ist.

Wir haben im vorstehenden die Elemente *Kalium, Natrium, Magnesium, Schwefel, Phosphor, Stickstoff und Kohlenstoff* quantitativ auf ihre Notwendigkeit im Verwendungsstoffwechsel des Timothee-bazillus untersucht und mag das Ergebnis graphisch dargestellt sein. Wir legten der Tafel die Werte zugrunde, von denen ab wir ein *sehr gutes Wachstum* des Timotheebazillus erzielten. Wir sehen, daß *Kalium* und *Natrium* entbehrlich sind, daß von *Schwefel* und *Magnesium* 0,01 Proz. erforderlich sind, und daß von *Phosphor, Stickstoff* und *Kohlenstoff* die zehnfache Menge wie bei Schwefel und Magnesium benötigt wird.

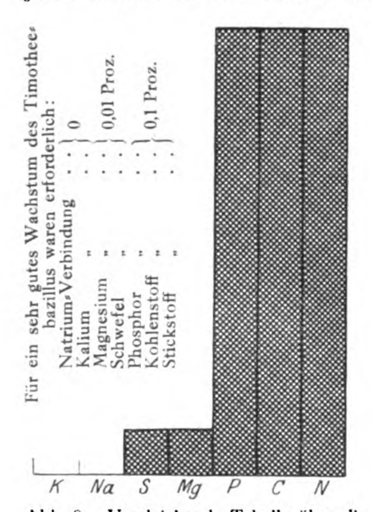


Abb. 8. Vergleichende Tabelle über die Wichtigkeit der einzelnen Elemente. Zeichenerklärung siehe Abb. 1 auf Seite 323.

II. Gestattet uns die Kenntnis des quantitativen Verwendungsstoffwechsels des Timothee- und des Trompetenbazillus optimale Nährböden für dieselben herzustellen?

In den vorhergehenden Versuchen wurde immer nur eine Komponente quantitativ variiert, und es ergab sich, daß von den verschiedenen lebensnotwendigen Elementen differente Mengen erforderlich waren. Es lag nun der Gedanke nahe, zu untersuchen, ob die *unter den von uns gewählten Bedingungen* günstigsten Mengen der unentbehrlichen Stoffe auch dann für das Wachstum günstig blieben, wenn man sie in der gefundenen optimalen Menge zusammenstellte.

Die Nährlösung, von der wir ausgegangen sind, war die Acetat-Ammoniaklösung, die ohne vorherige Kenntnis der quantitativen Bedürfnisse empirisch als brauchbar gefunden war. Ihre Zusammensetzung war:

Ammoniumsulfat	0,5 g
Magnesiumsulfat	0,005 g
Kaliumphosphatgemisch.	0,2 g
Natriumacetat	0,5 g
Aqua bidest. ad volumen	100 ccm

Wir wollen diese Lösung im vorliegenden Abschnitt als *Acetat-Ammoniaklösung I* bezeichnen. Vergleichen wir zunächst die Gewichtsverhältnisse der darin befindlichen Mineralsalze mit den von uns als

optimal gefundenen Mengen! Hierbei sehen wir von Kalium und Natrium ab, die aus früher angeführten Gründen bei der gewählten Versuchsanordnung keinen sichtbaren Einfluß auf das Wachstum des Timotheebazillus zeigten und für die wir infolgedessen kein Optimum finden konnten. Die in den vorher erwähnten Versuchen ermittelten optimalen Gewichtsmengen betrugen für:

Magnesium	(= Magnesiumsulfat) . . .	0,01 Proz.	und darüber.
Schwefel	(= Natriumsulfat)	0,01 ,,	
Phosphor	(= Kaliumphosphatgemisch .	0,1 ,,	
Stickstoff	(= Ammoniumchlorid) . . .	0,1 ,,	
Kohlenstoff	(= Natriumacetat)	0,1 ,,	

Der Vergleich zeigt einmal, daß in der Acetat-Ammoniaklösung I ein Teil der Elemente, und zwar *Schwefel, Phosphor, Stickstoff* und *Kohlenstoff* in Mengen den Bakterien dargeboten werden, die beträchtlich die unteren Grenzen der als optimal gefundenen Werte überschreiten. Beispielsweise enthält die Acetat-Ammoniaklösung I 0,5 Proz. eines Ammoniaksalzes, während 0,1 Proz. bereits zur Erzielung eines optimalen Wachstums genügt. Bei Natriumacetat befinden wir uns mit 0,5 Proz. ebenfalls oberhalb der unteren Grenze des gefundenen optimalen Wertes. Ähnliches zeigen die beiden anderen Verbindungen des Schwefels und Phosphors.

Andererseits ergibt sich, daß der Wichtigkeit des Magnesiums in der Acetat-Ammoniaklösung I nicht genügend Rechnung getragen wird, das sich hier mit 0,005 Proz. Magnesiumsulfat unterhalb seines Optimums befindet.

Es lag daher die Frage nahe, ob mit einer Lösung, in der die für *zu hoch befundenen Salzmengen reduziert* worden waren und der *Magnesiumsulfatgehalt* erhöht wurde, ein gleich gutes Wachstum der Bakterien zu erreichen war. Allerdings gingen wir mit der Reduktion nicht bis zur untersten Grenze der optimalen Mengen, sondern beschränkten uns darauf, die Acetat- und Ammoniakverbindungen auf die Hälfte der ursprünglichen Menge zu vermindern und die Magnesiumverbindung als einen der wesentlichen Ernährungsfaktoren auf 0,1 Proz. hinaufzusetzen. Die quantitativen Verhältnisse in dieser neu zusammengestellten Lösung, die wir im folgenden der Kürze halber als *Acetat-Ammoniaklösung II* bezeichnen wollen, waren:

Ammoniumsulfat	0,25 g	(statt 0,5 g)
Magnesiumsulfat	0,1 g	(statt 0,005 g)
Kaliumphosphatgemisch.	0,2 g	(wie bisher)
Natriumacetat	0,25 g	(statt 0,5 g)
Aqua bidest. ad volumen	100 ccm	

Als dritte Nährlösung nahmen wir die Acetat-Ammoniaklösung I und erhöhten in dieser lediglich den Magnesiumsulfatgehalt auf 0,1 Proz.

Die Zusammensetzung dieser als *Acetat-Ammoniaklösung III* bezeichneten Nährflüssigkeit war also folgende:

Ammoniumsulfat	0,5 g
Magnesiumsulfat	0,1 g
Kaliumphosphatgemisch.	0,2 g
Natriumacetat	0,5 g
Aqua bidest. ad volumen	100 ccm

Bezüglich der Herstellung der beiden letztgenannten Lösungen ist zu bemerken, daß das Magnesiumsulfat in dieser Konzentration aus der fertigen Nährlösung bei Erhitzung im Dampftopf ausfiel und wir dies dadurch umgingen, daß wir die Magnesiumlösung getrennt sterilisierten und erst erkaltet beide Lösungen vereinigten. Für jede der drei Lösungen, die Acetat-Ammoniaklösungen I, II und III stellten wir acht Kölbchen bereit, die wir mit 20 ccm der betreffenden Nährflüssigkeit füllten. Von diesen acht Kölbchen beimpften wir vier mit dem *Timotheebazillus* und vier Kölbchen mit dem *Trompetenbazillus*, welch letzterer ernährungsphysiologisch anspruchsvoller war und infolgedessen auf Variationen in dem Nährsubstrat stärker reagierte.

In der angegebenen Weise führten wir fünf Passagen durch.

Bei der Beurteilung des Wachstums waren wir darauf angewiesen, die in den einzelnen Kölbchen gewachsenen Häutchen miteinander zu vergleichen. Dabei war eine gewisse Subjektivität nicht ausgeschlossen und kleine oder selbst mittlere Wachstumsunterschiede waren schwer feststellbar. Bei der gewählten Versuchsanordnung war aber eine quantitative Bestimmung der jeweiligen Ernte durch *Wägung* nicht möglich.

Trotzdem konnten wir feststellen, daß auch bei einer *Reduktion* der wichtigsten Elemente, Stickstoff und Kohlenstoff, innerhalb der optimalen Grenzen bei genügender Anwesenheit der übrigen Stoffe in der Lösung II ein ebenso gutes Wachstum möglich war, wie in der Acetat-Ammoniaklösung I. Wiewohl wir in der Lösung II gegenüber der Acetat-Ammoniaklösung I die Mineralsalzmenge in 100 ccm von 1,205 g auf 0,8 g vermindert hatten, d. h. um mehr als ein Drittel, wuchs sowohl der Timotheebazillus als auch der Trompetenbazillus gut. Bezüglich Wachstumsschnelligkeit, Ausdehnung und Stärke der gewachsenen Häutchen innerhalb der einzelnen Passagen war für beide Stämme in beiden Nährflüssigkeiten *kein Unterschied* feststellbar. Beim Vergleich des Wachstums in den Acetat-Ammoniaklösungen I und III fiel nichts Besonderes auf. Dies hat seinen Grund wohl darin, daß der Magnesiumsulfatgehalt in der ersten der beiden Lösungen mit 0,005 Proz. sich in der Nähe der unteren Grenze der optimalen Menge befindet.

Es ergibt sich daraus, daß man mit der Kenntnis des quantitativen Verwendungsstoffwechsels eines Bakteriums sehr wohl die Mittel in der Hand hat, einen für bestimmte Zwecke optimalen Nährboden zu konstruieren.

In der Bakteriologie ist es das Streben, für die Reinzüchtung der Mikroorganismen *elektive* Nährböden zu benutzen, um die Bakterien auf diese Weise aus den Bakteriengemischen herauszuzüchten. Ist uns der Verwendungsstoffwechsel eines Bakteriums in *qualitativer* und *quantitativer* Hinsicht bekannt, so können wir einen Nährboden zusammensetzen, der für dieses günstig, für die Zucht anderer Mikroorganismen ungünstig ist.

Der für die elektive Züchtung optimale Nährboden muß natürlich nicht immer gleichzeitig auch der beste *für andere Zwecke* sein, so z. B. für die Giftbildung, Fermentbildung oder dergleichen. Hier werden möglicherweise *qualitativ und quantitativ andere Nährflüssigkeiten am günstigsten sein.* Die Methodik zur Auffindung dieser Nährböden wird sich im Prinzip auf der hier beschriebenen aufbauen.

Zur Kenntnis der Auxokörperwirkung.

Von

Martin Jacoby und **L. Rosenfeld** (Charkow).

(Aus dem biochemischen Laboratorium des Krankenhauses Moabit in Berlin.)

(Eingegangen am 18. März 1925.)

Vor einiger Zeit hat *L. Rosenfeld*[1]) im hiesigen Laboratorium Untersuchungen über das Verhalten der Urease gegen Alkohol begonnen, die er aus Mangel an Zeit leider nicht zu Ende führen konnte. *Rosenfeld* hat bereits Versuche über die Wirkung der Auxokörper im alkoholischen Milieu angestellt, die aber noch kein klares Resultat ergaben. Da *Rosenfeld* aus Zeitmangel die Versuche nicht zu Ende führen konnte, wurden sie nach seiner Abreise fortgesetzt.

Es war ermittelt worden, daß auch in alkoholischen Lösungen noch Ammoniak aus Harnstoff durch die Urease abgespalten wird[2]). Wir wollten nun prüfen, ob die Ammoniakbildung durch die Auxokörper verstärkt wird. Dabei ergab sich das interessante Resultat daß das sehr von der Konzentration des Alkohols abhängt.

Die Versuche wurden so angestellt, daß in den gleichzeitig angestellten Proben stets dieselbe Fermentmenge (Jackbohnenurease), dieselbe Phosphatkonzentration vorhanden und nur der Alkoholgehalt verschieden war. Jede Probe wurde einmal mit und einmal ohne Auxokörper angesetzt.

Versuche mit Cyankalium (pro Probe 20 mg).

	Ohne Auxokörper	Mit Auxokörper	Versuchsdauer
	I. Alkohol 70 proz. (Urease pro Dosis 0,016 g).		
1.	25,9	3,7	70 Stunden
2.	30,6	3,9	44 „
Alkohol in Proz.	II. Urease 0,016 g.		
80	14,9	2,6	44 Stunden
70	22,8	4,0	44 Stunden
60	26,5	18,4	44 Stunden

[1]) Diese Zeitschr. **154**, 141, 1924.

[2]) In der Arbeit von *Rosenfeld* steht versehentlich: Überall hat deutliche Harnstoffspaltung stattgefunden, wobei auch die Ammoniakbildung verstärkt ist. Statt „verstärkt ist" muß es heißen: „zu konstatieren ist".

Alkohol in Proz.	Ohne Auxokörper	Mit Auxokörper	Versuchsdauer
	III. Urease 0,016 g.		
60	25,5	14,2	44 Stunden
50	23,9	23,4	
40	29,2	33,5	
	IV. Urease 0,016 g.		
40	33,2	33,2	44 Stunden
30	48,5	61,1	
20	100,9	97,3	
	V. Urease 0,016 g.		
40	35,0	38,2	44 Stunden
30	—	64,7	
20	91,4	102,0	
	VI. Urease 0,016 g.		
40	33,4	34,3	44 Stunden
30	54,5	63,9	
20	104,4	97,4	
	VII. Urease 0,011 g.		
40	22,4	28,2	20 Stunden
30	35,8	44,4	
20	60,1	64,7	
	VIII. Urease 0,011 g.		
20	59,7	70,4	20 Stunden
10	84,5	96,6	
0	112,7	128,8	

Auch mit Glykokoll als Auxokörper wurden zahlreiche Versuche angestellt. Jedoch soll über diese Versuche erst später berichtet werden.

Die Versuche mit Cyankalium zeigen also deutlich, daß bei genügender Alkoholkonzentration — etwa von 60 Proz. an — Cyankalium die Ureasewirkung nicht fördert, sondern deutlich hemmt.

Nunmehr wurde geprüft, ob bei einer hohen Alkoholkonzentration, bei der also Cyankalium deutlich die Ammoniakbildung hemmt, etwa der Harnstoff dennoch bis zu einem Zwischenprodukt gespalten wird. Das wäre nach den Beobachtungen von *Iwanoff*[1]) denkbar, der bei 80proz. Alkoholkonzentration die Harnstoffspaltung stärker fand als die Ammoniakbildung vermuten ließ. Versuche mit Auxokörpern hat *Iwanoff* nicht gemacht.

Die Versuche wurden so angestellt, daß Proben für die Ammoniakverarbeitung und Parallelproben für die Verarbeitung mit dem Xanthydrolverfahren nach *Fosse* angesetzt wurden. Die Mischungen waren genau so zusammengestellt wie in den oben geschilderten Versuchen. Das Verfahren von *Fosse* gibt, wie wir uns in methodischen Versuchen überzeugt haben, gute Resultate.

[1]) Diese Zeitschr. **150**, 108, 1924.

Die Versuche wurden bei 70proz. Alkoholkonzentration angestellt. Bemerkenswert ist, daß am Schlusse der 20stündigen Brutschrankeinwirkung ein deutlicher Unterschied zwischen den Proben mit und ohne Cyankalium schon äußerlich zu sehen ist. Bei den Proben ohne Cyankalium beobachtet man am Boden des Gefäßes Nadeln (Harnstoff ?), die bei den Proben mit Cyankalium fehlen. Die Cyankaliumproben sind milchig getrübt.

Die Menge des Harnstoffs betrug 0,3 g, die der Urease 0,016 g.

Wir geben zwei Beispiele von Versuchen mit 70proz. Alkoholkonzentration.

Ohne Cyankalium wurden 23,5 Proz. des Harnstoffs, mit Cyankalium 2,5 Proz. des Harnstoffs als Ammoniak wiedergefunden.

Ohne Cyankalium waren noch 78,7 Proz. als Harnstoff, mit Cyankalium 99,7 Proz. als Harnstoff vorhanden.

In einem anderen Versuche ohne 23,7 Proz., mit 3,7 Proz. als Ammoniak — 71,3 Proz. wurden ohne Cyankalium als Harnstoff wiedergefunden, bei der Kontrolle der gesamte Harnstoff.

In einem Versuche in wässeriger Lösung entsprach der größeren Ammoniakmenge bei Cyankaliumgegenwart ein geringerer Harnstoffgehalt, nach *Fosse*. Ob aber etwa bei der Bestimmung nach *Fosse* auch Zwischenprodukte der Harnstoffspaltung mit Xanthydrol reagieren, muß besonders geprüft werden.

Nach unseren Versuchen besteht also die bei hoher Alkoholkonzentration zustande kommende Hemmung durch Cyankalium nicht darin, daß der Harnstoff nur bis zu einem Zwischenprodukt, aber nicht bis zu Ammoniak gespalten wird. Es ist also bei 70proz. Alkohol auch die Harnstoffspaltung selbst durch Cyankalium gehemmt. Die Versuche in wässeriger Lösung zeigen, daß wenigstens bei unserer Versuchsanordnung ein vollkommener Parallelismus zwischen Harnstoffspaltung und Ammoniakbildung besteht. Bei Gegenwart von Cyankalium wird mehr Harnstoff gespalten und mehr Ammoniak gebildet. Es besteht also bisher hier kein Anhaltspunkt dafür, daß etwa, wie es *Willstätter* und *Grassmann*[1]) beim Papain gefunden haben, durch Cyankalium die Art der Spaltung qualitativ geändert wird.

Die Versuche werden fortgesetzt.

[1]) Zeitschr. f. physiol. Chem. **138**, 184, 1924.

Zur Kenntnis der optischen Desensibilisation bei Warmblütern.

Von

Tatsuo Awoki (Utsunomiya).

(Aus der Lupusheilstätte in Wien, Lichtinstitut.)

(Eingegangen am 19. März 1925.)

In den nachstehenden Ausführungen soll über Untersuchungen berichtet werden, die zur Frage der optischen Desensibilisation bei Warmblütern angestellt wurden.

H. Shibuya[1]) hat vor kurzem in einer Mitteilung aus dem hiesigen Institut gezeigt, daß der stark porphyrinhaltige Harn eines Hydroakranken weiße Mäuse lichtempfindlich machte, während derselbe Harn innerhalb der Beobachtungszeit Paramaecien nicht sensibilisierte. Im Hinblick auf die Angabe von *H. Fischer*[2]) über das Vorkommen eines eiweißartigen Körpers im Harne dieses Patienten wurde von *H. Shibuya* weiter untersucht, ob man imstande ist, Hämatoporphyrin (Hp.) durch Zusatz von Eiweiß seiner sensibilisierenden Eigenschaften für weiße Mäuse zu berauben, wie dies nach den bekannten Untersuchungen von *G. Busck*[3]) bei der Wirkung sensibilisierender Körper auf Paramaecien oder Erythrocyten ohne weiteres möglich ist. Es stellte sich nun heraus, daß man in einigen Fällen bei Injektion von Serumporphyringemengen die sensibilisierende Wirkung des Hp. auf weiße Mäuse herabsetzen konnte, während dies in einer Reihe von anderen Versuchen nicht der Fall war. Seither hat *G. O. E. Lignac*[4]) in bemerkenswerten Untersuchungen gezeigt, daß man imstande ist, durch vorherige intramuskuläre Einspritzungen von $CaCl_2$-Lösungen den Tod von Hp.-Mäusen im Lichte zu verhüten, ebenso die Hautentzündung und die Nekrose bei der subakuten Form dieser Sensibilisationskrankheit.

---

[1]) Strahlentherapie 18, 710, 1924; vgl. auch *H. Shibuya*, ebendaselbst 17, 412, 1924. — Vgl. ferner *H. Fischer* und *W. Zerweck*, Zeitschr. f. phys. Chem. **187**, 176, 1924.

[2]) Münch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 36.

[3]) Diese Zeitschr. **1**, 425, 1906.

[4]) Krankheitsforschung **1**, 177, 1925.

Die akuten Reizerscheinungen (Kratzen, Beißen usw.) waren jedoch bei den „Kalkmäusen" *Lignacs* vorhanden, auch waren die Tiere einige Zeit nach der Belichtung matt. Die Hyperämie war zu sehen, doch war sie geringer als bei den nicht mit $CaCl_2$ vorbehandelten Tieren.

Zur Klärung der Desensibilisationsfrage von Warmblütern habe ich nun auf Veranlassung von Herrn Professor *Hausmann* zunächst einige ergänzende Versuche in der erwähnten Richtung mit dem Harne eines Hydroakranken und mit Eiweißporphyringemengen angestellt. Ferner wurde versucht, mit anderen Substanzen, mit denen man optische Desensibilisation in vitro sicher erzielen kann, auch die Sensibilisation von Warmblütern durch Hp. zu verhindern. Hp. wurde auch in diesem Falle gewählt, weil die unter bestimmten Voraussetzungen rasch und sicher eintretende Gesamtsensibilisierung von Warmblütern nach unseren Erfahrungen bisher mit keinem anderen Farbstoff in demselben Maße erzielt werden konnte.

Beim Vergleich von Desensibilisation in vitro und in vivo mußte versucht werden, unter möglichst ähnlichen Bedingungen zu arbeiten. Deshalb wurden die Parallelversuche an Erythrocyten und Warmblütern derart angestrebt, daß Blutkörperchenemulsionen, deren Volumen annähernd dem Gewichte der Mäuse entsprach, mit derselben Menge Hp. und dem zu untersuchenden Desensibilisationsstoffe versetzt wurden, wie sie die Mäuse erhielten.

Hierdurch sind Verhältnisse geschaffen, die für die Entgiftung in vitro eher ungünstiger liegen als in vivo, da bei lebenden Tieren bei der Gewichtsbestimmung Körperteile in Rechnung gezogen werden, die mit der Wirkung der sensibilisierenden Substanzen kaum etwas zu tun haben.

Wie erheblich aber die Wirkung der Verdünnung auf die desensibilisierende Eigenschaft des Serums auf fluoreszierende Körper sein kann geht aus den Untersuchungen von *A. Jodlbauer* und *T. Kudo*[1]) hervor, die z. B. fanden, daß bei der 33fachen Verdünnung die durch das Serum aufgehobene sensibilisierende Wirkung des Dichloranthracens wieder auftrat. Bei weiterer Verdünnung verschwand die hemmende Wirkung des Serums ganz.

Noch schwieriger als die Angleichung an die Verdünnungsverhältnisse bei Parallelversuchen in vivo und in vitro erscheint die Angleichung an die Temperatur. Bei Lichtreaktionen spielt die Temperatur in der Regel keine erhebliche Rolle. Ein Unterschied in dem Verhalten gegen Desensibilisation bei Versuchen in vitro und in vivo ist wohl eher als Wirkung der Warmblüterorganismen auf den betreffenden Prozeß oder auf die zur Verwendung kommenden Substanzen, als im Sinne eines

---

[1]) Diese Zeitschr. **13**, 25, 1908.

Einflusses der Temperatur zu deuten. Wir haben deshalb vom Vergleich von Reagenzglasversuchen in vitro bei Körpertemperatur und bei Zimmertemperatur derzeit abgesehen, behalten uns aber vor, diese im Verein mit Parallelversuchen an wechselwarmen Tieren später nachzuholen [1]).

Bei den Desensibilisationsversuchen stand uns auch diesmal von Herrn Professor *Hans Fischer* in München dargestelltes Hp. zur Verfügung, für dessen Überlassung wir unseren herzlichsten Dank aussprechen möchten.

I. Sensibilisation weißer Mäuse mit Hydroaharn.

H. Shibuya [2]) konnte mit einem lange Zeit hindurch konservierten Harn des bekannten Hydroakranken *P.* Sensibilisation weißer Mäuse in den sichtbaren Spektralbezirken erzielen, während Paramaecien von diesem Harne nicht sensibilisiert wurden. Wir haben nun mit einem uns neuerlich von Herrn Professor *Fischer* übersandten stark porphyrinreichen Harn dieses Patienten an zwei weißen Mäusen identische Resultate erzielt. Der Harn war nicht konserviert, reagierte bei der Ankunft aus München stark sauer und hatte den auffallenden, etwas fäkulenten Geruch, den der Harn dieses Patienten nach *H. Fischer* immer besaß. Mit diesem Harne wurde der nachstehend mitgeteilte Versuch angestellt.

Versuch.

Stark porphyrinhaltiger Harn des Patienten *P.* aus München. Der am 29. Dezember 1924 abgesandte Harn kommt infolge einer Verzögerung durch das Zollamt am 3. Januar 1925 ins Laboratorium und wird sofort verwendet. Der Harn ist stark sauer und riecht eigentümlich fäkulent. 10 ccm des Harnes werden mit 2,5 ccm n/10 Natronlauge neutralisiert, hiervon erhalten vier Mäuse je 2 ccm subkutan. Maus I (20 g) und Maus II (21 g) werden von 17 Uhr 30 Minuten bis 19 Uhr 30 Minuten mit dem Kohlenbogenlichte (70—80 Amp. 50—60 Volt) in einer Entfernung von 40 cm unter Vorschaltung einer 10 ccm dicken Wasserküvette bestrahlt. Die Tiere zeigen keine besonderen Reizerscheinungen, nur ab und zu Kratzen. Die Ohren röten sich bald nach Beginn der Bestrahlung, um dann etwas abzublassen. Gegen Ende der Bestrahlung springen beide Tiere hoch auf. Um 19 Uhr 30 Minuten ist Maus I gedunsen, Ohren gerötet, nach vorn gerichtet. Maus II dasselbe. Um 23 Uhr 30 Minuten dasselbe. Am 4. Januar 1925, 9 Uhr, werden beide Tiere totenstarr aufgefunden. Zeigen das typische Aussehen der subakuten Sensibilisation mit Porphyrinen. Die zwei anderen Mäuse (17,5 und 22,2 g), die dieselbe Harnmenge erhalten hatten, zeigten keine Veränderungen und lebten am 4. Januar. Am 5. Januar wurde die eine tot gefunden, die zweite blieb am Leben.

Mit dem neutralisierten Harn wurde ferner ein Paramaecienversuch in der Weise unternommen, daß zwei Proben von je 5 ccm Harn mit der-

[1]) Über Desensibilisation in vitro vgl. die wichtigen Untersuchungen von *P. Metzner*, Biochem. Zeitschr. 148, 498, 1924.

[2]) l. c.

selben Menge einer Paramaecienkultur versetzt wurden. Beide Proben wurden geteilt, je eine Hälfte zugleich mit den Mäusen belichtet, die andere im Dunkeln belassen. Nach Beendigung des Versuchs lebten alle Licht- und Dunkeltiere, dasselbe am 5. Januar abends, doch sind in den Lichtproben einige Paramaecien verendet, viele noch am Leben.

Es wäre wünschenswert, wenn derartige Versuche mit dem *ganz frischen*, aus dem Körper entleerten, porphyrinhaltigen Harn von Hydroakranken wiederholt werden könnten, da sie nach der Art der Reaktion des Hydroakranken zum Licht schwer verständlich sind. In dieser, wie in *Shibuyas* Beobachtungen handelt es sich um Wirkung der sichtbaren Spektralbezirke, während nach den Forschungen von *L. Freund*[1]) im wesentlichen die kurzwellige Strahlung für die Entstehung der Hydroaeruption in Betracht kommt. Dieser Gegensatz, auf den *W. Hausmann* schon öfters hingewiesen hat, ist noch immer unerklärt. Abgesehen davon, besteht auch hier der schon wiederholt erwähnte Gegensatz, daß die Hydroa unter einem ganz anderen Bilde verläuft als die Sensibilisation mit Hämatoporphyrin, während andererseits nach den bekannten Selbstversuchen von *Meyer-Betz* die Sensibilisation des Menschen mit Hp. ganz analog der der weißen Mäuse verläuft.

Deshalb werden wir jedenfalls annehmen müssen, daß eine Resorption des Porphyrins aus dem Harn bei Hydroakranken in der Regel nicht erfolgt. Vielleicht ist aber daran zu denken, daß bei etwaigem pathologischen Auftreten der Rückresorption des Porphyrins aus der Harnblase die Hydroakranken in der Art der weißen Mäuse gegen Licht sensibilisiert würden. Es ist noch kurz darauf hinzuweisen, wie ungemein rasch das mit dem porphyrinreichen Harn injizierte Porphyrin den Mauskörper verläßt. Wenige Minuten nach der Injektion wurde von den Tieren schon intensiv rotgefärbter Harn entleert, ein Verhalten, das durch die von *H. Fischer* beschriebene ideale Harnfähigkeit des Uroporphyrins erklärt ist.

II. Verhalten von Eiweißporphyringemengen bei Sensibilisation von Warmblütern.

Mit einigen Worten sollen nun ferner Versuche berührt werden, die mit Gemengen von Eiereiweiß und Porphyrin, sowie mit Porphyrinlösungen unter dem Zusatze von Serum vorgenommen wurden.

In einem Versuche, der unter Zusatz von Eiklar unternommen wurde, war kein wesentlicher Schutz festzustellen. Zwei Mäuse, von denen die eine Hp.-Lösung mit Eierklar gemengt erhielt, die andere Hp.-Lösung in entsprechendem Volumen ohne Zusatz erhalten hatte, reagierten annähernd gleich stark auf Kohlenbogenbelichtung. Im

[1]) Vgl. Wien. klin. Wochenschr. 1912, Nr. 5.

weiteren Verlaufe traten die Symptome der chronischen Sensibilisation bei dem mit Eiklar injizierten Tiere eher stärker auf.

Doch war in diesem Falle noch nicht festgestellt worden, wie sich Eiweißporphyrinmengen in einer Blutkörperchenlösung verhalten und die ihrem Volumen nach dem Gewichte der Mäuse entsprechen.

Ein derartiger Versuch ergab, daß ein ungemein großer Zusatz von Eiklar — das Versuchstier erhielt 0,3 ccm Hp.-Lösung (0,01/10), vermischt mit 2,8 ccm Eiklar — keinerlei Herabsetzung der akuten Reizerscheinungen im Lichte gegenüber der Kontrolle ergab. Der Tod des „Eiklartieres" erfolgte 19 Stunden nach Aufhören der einstündigen Bestrahlung, das Kontrolltier war nach 24 Stunden stark subakut gedunsen. Die dem Mäusegewichte entsprechende Blutkörperchenaufschwemmung, die mit derselben Eiklarmenge und nur dem dritten Teile der Hp.-Lösung versetzt worden war, zeigte gegenüber der entsprechenden Kontrolle ohne Eiklar nur Verzögerung der Lichthämolyse, entsprechend den Erfahrungen von *Busck* über die schwächere desensibilisierende Wirkung des Eiklars gegenüber Serum. Bei dem Tod des „Eiklartieres" ist übrigens daran zu denken, ob nicht die überaus große Eiklarmenge giftig gewirkt hat.

Schließlich sind noch einige Versuche wiedergegeben, die mit inaktiviertem Serum analog den Untersuchungen von *H. Shibuya* ausgeführt waren, doch sind in diesen Beobachtungen die Kontrollen mit dem dem Mausgewicht entsprechenden Volumen der Blutkörperchenaufschwemmung ausgeführt worden.

Versuch 1.

1. *Mäuseversuch.* Weiße Maus I, 17 g, erhält am 7. Februar 1925 um 16 Uhr 55 Minuten eine Mischung von 0,2 ccm Hp. (0,01/10) und 1 ccm inaktivierten menschlichen Mischserums, Maus II, 20 g, 0,2 ccm Hp. und 1 ccm 0,9proz. NaCl subkutan. Die Tiere werden von 17 Uhr 30 Minuten bis 19 Uhr im Kohlenbogenlichte bestrahlt. Bei Maus II beginnen die Sensibilisationssymptome augenblicklich mit dem Beginn der Bestrahlung, bei Maus I einige Minuten später und sind während der ganzen Bestrahlungsdauer schwächer, immerhin aber deutlich ausgesprochen. Bei Maus II röten sich die Ohren, bei Maus I kaum. Beim Abschluß der Bestrahlung zeigt Maus II deutlich das Bild der beginnenden subakuten Sensibilisation, Maus I erscheint ziemlich normal. Dasselbe Verhalten nach 2 Stunden und 5 Stunden. Am 8. Februar 12 Uhr ist Maus I anscheinend normal, Maus II zeigte ausgesprochene Symptome der subakuten Sensibilisation, Ödeme, injizierte, ödematöse nach vorn gerichtete Ohren, sehr matt. 18 Uhr 45 Minuten, Maus I anscheinend normal; Maus II, das höchst ödematöse Tier, verendet unter tetanischen Erscheinungen. Maus I am 10. Februar, 20 Uhr, normal.

2. *Blutversuch.* 7. Februar 1925, je 5 ccm 1proz. Erythrocytenaufschwemmung werden mit 0,2 ccm Hp. und 1 ccm Serum (wie oben) (Probe 1) bzw. mit 0,2 ccm Hp. und 1 ccm 0,9proz. Kochsalz (Probe 2) versetzt,

ebenso 20 ccm Erythrocytenaufschwemmung mit 0,2 ccm Hp., und 1 ccm Serum (Probe 3) bzw. mit 0,2 ccm Hp. und 1 ccm Kochsalz (Probe 4). Die Proben werden geteilt. Je ein Teil von 17 Uhr 30 Minuten bis 18 Uhr 30 Minuten im Kohlenbogenlichte unter Wasserkühlung belichtet, der andere im Dunkeln belassen. Lichtprobe von 2 ist nach 30 Minuten, Lichtprobe von 4 nach 48 Minuten komplett hämolysiert. Lichtprobe von 1 und 3 bei Beendigung der Belichtung negativ, 2 Stunden später zeigt Lichtprobe 3 beginnende Hämolyse, Lichtprobe 1 und alle Dunkelkontrolle bis auf Probe 2, die einige Zeit im diffusen Lichte gestanden hatte und beginnende Hämolyse zeigte, negativ. Am 8. Februar 1925, 12 Uhr ist Lichtprobe 1 nicht hämolysiert, stark agglutiniert, Lichtprobe 3 zeigt starke Hämolyse. Dunkelproben 1, 3, 4 negativ, Dunkelprobe 1 sehr stark agglutiniert, Dunkelprobe 2 deutliche Hämolyse, Dunkelprobe 3 Andeutung von Agglutination. 18 Uhr 45 Minuten Lichtprobe 1 Spur Hämolyse, Lichtprobe 3 fast ganz komplett. Dunkelprobe 2 komplett, Dunkelprobe 1, 3 und 4 negativ. Agglutination wie oben.

In diesem Falle war demnach der Eintritt der akuten Sensibilisationssymptome bei der weißen Maus durch das Serum wenig aufgehalten worden, wohl aber der der subakuten. Der Vergleich mit dem Blutversuche, der in ähnlichem Volumenverhältnis ausgeführt war zeigt, daß bei der Verwendung von 20 ccm Blutkörperchenemulsion der Serumschutz nur ein unvollständiger war, während er bei 5 ccm der Blutkörperchenaufschwemmung noch völlig hinreichte.

Dieser Versuch legte es nahe, möglichst große Serummengen zu verwenden. Doch wird, wie aus dem nachfolgenden Versuche hervorgeht auch bei Verwendung einer Serummenge, die vollkommen hinreicht um Blutkörperchen in vitro zu schützen, immer noch das Auftreten der akuten Reizerscheinungen nicht vermieden.

Versuch 2.

a) Mäuseversuch. Weiße Maus I, 16,5 g, erhält am 10. Februar 1925 17 Uhr 22 Minuten, 0,2 ccm Hp. + 2,8 ccm inaktivierten menschlichen Mischserums; Maus II, 20 g, 0,2 ccm Hp. + 2,8 ccm 0,9 proz. NaCl-Lösung. Die Tiere werden von 17 Uhr 39 Minuten bis 18 Uhr 39 Minuten im Kohlenbogenlichte bestrahlt. Beide Tiere zeigen gleichmäßige heftige Reizerscheinungen seitens der Körperoberfläche (Beißen, Kratzen, Unruhe). Während bei Maus II wenige Minuten nach der Bestrahlung intensive Rötung der Ohren einsetzt, bleiben die Ohren von Maus I blaß. Am Ende der Bestrahlung ist Maus I ohne besonderen Befund, Maus II ziemlich subakut gedunsen, stark injizierte und ödematöse Ohren. 21 Uhr dasselbe. 11. Februar 1925, 8 Uhr, Maus I wie oben, Maus II Ohren stark gerötet und ödematös deutlich subakut. Am 12. Februar, 8 Uhr, Maus I wie oben, Maus II langsam nachlassend. Im weiteren Verlauf bleibt Maus I unverändert; Maus II pathologische Erscheinungen verschwinden allmählich.

b) Blutversuch. Je 17 ccm 1 proz. Erythrocytenaufschwemmung werden mit 0,2 ccm Hp. und 2,8 ccm inaktivierten menschlichen Mischserums (Probe 1), bzw. 0,2 ccm Hp. und 2,8 ccm 0,9 proz. NaCl-Lösung (Probe 2) versetzt, geteilt; je ein Teil im Kohlenbogenlichte belichtet, einer im Dunkeln belassen. Lichtprobe 2 ist nach 38 Minuten komplett

hämolysiert. Die Lichtprobe von 1 wie beide Dunkelproben nach 24 Stunden negativ. Die beiden Serumproben, licht und dunkel, stark agglutiniert.

Eine für das Körpergewicht der Maus ungemein große Serummenge, die in derselben Verdünnung Blutkörperchen vollkommen schützte, reichte nicht dazu aus, um die nervösen Erscheinungen bei der sensibilisierten Maus im Lichte zu verhindern, sie schützte aber vor den Symptomen, die, wie die Injektion der Ohren, Ödem usw., auf pathologische Veränderungen der Gefäße zurückzuführen sind.

Allerdings müßten im Hinblick auf die im hiesigen Institut gemachten Erfahrungen von *H. Shibuya* über die Inkonstanz in der Schutzwirkung des Serums derartige Untersuchungen in größeren Versuchsreihen wiederholt werden.

III. Das Verhalten reduzierender Substanzen bei der Gesamtsensibilisation von Warmblütern.

Schon in den ersten Untersuchungen, die *Hermann von Tappeiner*[1]) und seine Schule in Verfolg einer Auseinandersetzung mit *Ledoux-Lebard* unternahmen, wurde festgestellt, daß zum Zustandekommen der photodynamischen Wirkung Sauerstoff nötig sei. Dementsprechend gelingt es auch, durch Sauerstoff an sich reißende Körper die photodynamische Wirkung aufzuheben, wie dies wohl zuerst von *G. Sacharoff* und *Hans Sachs*[2]) festgestellt worden ist. Diese Autoren untersuchten die Rolle des Sauerstoffs bei der photodynamischen Wirkung auf Erythrocyten. Durch Zusetzen eines Sauerstoffängers konnte die Hämolyse durch Erythrosin im Sonnenlicht vollständig unterdrückt werden. Bei längerer Belichtung der Gemische ließ die Wirkung nach, da dann alles Sulfit zu Sulfat umgewandelt wird, und die Wirkung der sensibilisierenden Substanzen sich wieder entfalten kann. Durch die grundlegenden Untersuchungen *C. Neubergs*[3]) haben diese Beobachtungen ihre exakte Begründung erfahren.

K. Noack[4]) zeigte dann, daß man durch Natriumsulfit die lichtkatalytische Oxydation pflanzlicher Chromogene hemmen könne. Dieser Autor wies ferner in Übereinstimmung mit den Befunden von *G. Sacharoff* und *Hans Sachs* nach, daß man durch Natriumsulfit die photodynamische Wirkung des Eosins auf Paramaecien aufheben kann, wobei die Belichtungsstärke eine große Rolle spielt. Ebenso konnte *Noack* die photodynamische Wirkung des Eosins auf die Plasmastörung von Vallisneria durch Natriumsulfit unterdrücken. Bei anderen, an pflanzlichem Material angestellten Versuchen ließ sich

[1]) Vgl. Ergebn. d. Physiol. 8, 698, 1909.
[2]) Münch. med. Wochenschr. 1905, Nr. 7.
[3]) Biochem. Zeitschr. **13**, 17, 27, 29, 39, 44, 71.
[4]) Zeitschr. f. Bot. **12**, 273, 1920.

ebenfalls die entgiftende Wirkung des Natriumsulfits gegen die photodynamische Wirkung fluoreszierender Körper erweisen.

a) Natriumsulfit (Na_2SO_3).

Bei den Versuchen mit Natriumsulfit wurde in der Regel wasserfreies Natriumsulfit (*Kahlbaum*) verwendet. Das Salz wurde meist in 3—4proz. Lösung, in physiologischer Kochsalzlösung subkutan verabreicht. Die Lösungen wurden stets frisch zubereitet.

Versuch.

Weiße Maus I, 23 g, erhält am 6. November 1925 um 17 Uhr 05 Minuten subkutan 0,2 ccm Hp. (0,01/10) und 0,8 ccm 0,9proz. NaCl; Maus II, 22 g. 0,2 ccm Hp. und 0,8 ccm 3proz. Na_2SO_3[1]) in 0,9proz. NaCl-Lösung. Ferner werden 0,2 ccm Hp. und 0,8 ccm 0,9proz. NaCl (a) bzw. 0,2 ccm Hp. und 0,8 ccm 3proz. Na_2SO_3 (b) zu je 5 ccm einer 1proz. Aufschwemmung gewaschener Hammelblutkörperchen zugesetzt, ebenso 0,2 ccm Hp. und 0,8 ccm 0,9proz. NaCl (c) bzw. 0,2 ccm Hp. und 0,8 ccm 3proz. Na_2SO_3 (d) mit je 19 ccm derselben Blutkörperchenaufschwemmung versetzt.

1. *Mäuseversuch.* Beide Mäuse werden von 17 Uhr 30 Minuten bis 18 Uhr 30 Minuten dem Kohlenbogenlichte ausgesetzt und zeigen ziemlich gleichmäßig die Erscheinungen der Hp., Sensibilisation, Kratzen, Unruhe usw. Am Ende der Bestrahlung ist Maus I etwas mehr gedunsen als Maus II. Um 20 Uhr ist Maus I stark, Maus II bedeutend weniger gedunsen. Die Tiere werden in der der Jahreszeit entsprechenden schwachen diffusen Beleuchtung stehengelassen. Am 7. November 1924, 7 Uhr 30 Minuten, ist Maus I stark subakut, Maus II weniger. 19 Uhr 30 Minuten ist Maus I wie am Morgen, Ohren ödematös nach vorn gerichtet, Maus II ist schwach subakut. Ohren rötlich , nicht ödematös. Ähnlich am 9. November 1924. Um 19 Uhr zeigt Maus I Thrombosen der Ohrenspitzen, Maus II normal. Am 11. November 1924: Maus I Ohren teilweise nekrotisiert, Maus II keine Erscheinungen.

2. *Blutversuch.* Die Blutkörperchenproben werden geteilt. Je ein Teil von 17 Uhr 30 Minuten bis 18 Uhr 30 Minuten unter Wasserkühlung mit Kohlenbogenlicht zugleich mit den Mäusen und in derselben Entfernung belichtet. Lichtprobe von a ist nach 4 Minuten komplett, von b um 18 Uhr 30 Minuten negativ, von c nach 12 Minuten komplett, von d 18 Uhr 30 Minuten fraglich. Um 20 Uhr ist Lichtprobe von b negativ, von d komplett, alle Dunkelproben negativ. Nach 24 Stunden ist Lichtprobe von b spurenweise hämolysiert. Alle Dunkelproben negativ.

Aus diesen Versuchen geht hervor, daß unter Umständen durch gleichzeitige Verabreichung von Natriumsulfit mit Hämoporphyrin die sensibilisierende Wirkung dieses Farbstoffs für weiße Mäuse infolge seiner Wirkungen etwas herabgesetzt werden kann. Diese Wirkung ist aber nicht konstant, wie ja auch in den früheren Beobachtungen von *H. Shibuya* mit inaktiviertem Serum beobachtet worden war. Daß der Verdünnungsgrad nicht ohne Einfluß ist, geht aus dem

[1]) In diesem Versuche wurde nicht entwässertes Sulfit verwendet.

Hämolyseversuch hervor. Bei größerer, das Tiergewicht noch nicht erreichender Verdünnung war die Schutzwirkung des Natriumsulfits, wie in den Versuchen von *Jodlbauer* und *Kudo*, eine geringe. Es ist nicht ausgeschlossen, daß — wie oben angeführt — diese Verdünnungsverhältnisse für die relativ geringe Schutzwirkung des Natriumsulfits im Tierversuche maßgebend sind.

In einem zweiten Versuche waren die Reizerscheinungen bei dem mit Hp. und Na_2SO_3 injizierten Tiere ebenfalls sehr heftige. Bei dem Tiere, welches Na_2SO_3 erhalten hatte, blieben jedoch die Zeichen der subakuten Sensibilisation fast ganz aus. In diesem Falle war bei der Blutkontrolle mit der dem Mausgewicht entsprechenden Menge Schutzwirkung zu konstantieren gewesen.

Bei anderen Beobachtungen konnte jedoch keinerlei erhebliche Schutzwirkung des Na_2SO_3 für weiße Mäuse festgestellt werden. Der Steigerung der Sulfitdosis, wie sie bei den Serumversuchen ohne weiteres durchführbar ist, wird naturgemäß durch die Toxizität des Sulfits eine Grenze gesetzt.

b) Natriumthiosulfat ($Na_2S_2O_3$).

K. Noack hat eine geringfügige Hemmung der Lichtwirkung des Eosins auf Paramaecien durch Natriumthiosulfat beschrieben.

Wir konnten in vereinzelten Versuchen bei weißen Mäusen keine Abschwächung der sensibilisierenden Wirkung des Hämatoporphyrins erzielen, auch war die abschwächende Wirkung des Thiosulfats auf die photodynamische Wirkung des Hämatoporphyrins auf Erythrocyten ungleich geringer als die des Natriumsulfats.

c) Natriumhydrosulfit ($Na_2S_2O_4$).

Versuche mit diesem ungemein starken Reduktionsmittel konnten mit Hp.-Lösungen nicht ausgeführt werden, weil beim Zusatz zu Hp.-Lösungen Hp. sofort ausgeschieden wurde. Hierauf beruhte auch eine anscheinende Schutzwirkung, die wir bei dem ersten Versuch mit diesem Körper an weißen Mäusen erzielten.

Versuch.

Weiße Maus I, 21 g, erhält am 15. Januar 1925 0,2 ccm Hp. und 0,3 ccm $Na_2S_2O_4$ (0,2/15). Der Zusatz von $Na_2S_2O_4$ zu der Hp.-Lösung verursacht sofort die Ausfällung des Hp. Trotzdem wird die Flüssigkeit injiziert. Ein Kontrolltier (Maus II), 17 g, erhält 0,2 ccm Hp. und 0,3 ccm 0,9proz. NaCl. Die im Kohlenbogenlicht durch 1 Stunde erfolgte Bestrahlung ergab deutliche Sensibilisation bei beiden Tieren, bei Maus II jedoch erheblich stärker als bei Maus I. 1 Stunde nach Abschluß der Bestrahlung ist Maus I bis auf schwach injizierte Ohren normal, Maus II schwach subakut. 16. Januar 1925, 8 Uhr, Maus I normal, Maus II stark subakut. 21 Uhr dasselbe. Am 17. Januar, 8 Uhr, Maus I nichts abnormales, Maus II tot gefunden.

Es wurde nun versucht, durch kurz nach der Hp.-Gabe beigebrachte Injektion von $Na_2S_2O_4$ die Sensibilisationswirkung aufzuheben. Dies gelang nicht. Hingegen war es möglich, die sensibilisierende Wirkung von Äthylchlorophyllid, das wir der Güte des Herrn Geheimrat *Willstätter* in München verdanken, sowie die des Rose bengale auf Erythrocyten durch $Na_2S_2O_4$ deutlich zu verzögern, doch macht die stark hämolysierende Wirkung des Natriumhydrosulfits es schwer möglich, in höherer Konzentration dieses Präparats mit Blutkörperchen zu arbeiten.

IV. Wirkung von Kohlehydraten.

Die desensibilisierende Wirkung der Kohlehydrate in vitro wurde von *A. Jodlbauer* beschrieben und von *Hasselbach* bestätigt.

In einem von *H. Shibuya*[1]) im hiesigen Institut unternommenen Versuche wurde mit subkutaner, gleichzeitiger Injektion von Porphyrin mit geringfügigen Mengen 7,8 proz. Rohrzucker- bzw. 4,1 proz. Traubenzuckerlösung keine Verminderung der sensibilisierenden Eigenschaften des Hp. erzielt.

Wir haben deshalb versucht, analog unseren Erfahrungen über die desensibilisierende Wirkung größerer Serummengen mit erheblich größeren Kohlehydratquantitäten, die Wirkung des Hp. im Lichte auf weiße Mäuse aufzuheben.

Bei dieser Gelegenheit wurden wir auf die hochtoxische Wirkung aufmerksam, die durch subkutane Verabreichung konzentrierter Kohlehydratlösungen bei weißen Mäusen erzielt werden können. Über diese Erfahrungen wird an anderer Stelle vorläufig berichtet[2]).

Wählten wir aber die Menge des zu injizierenden Zuckers derart, daß sie eben von den Tieren noch vertragen wurde, so konnten wir keine deutliche abschwächende Wirkung wahrnehmen.

Versuch.

Weiße Maus 11,7 g, erhält am 5. Februar 1925 um 17 Uhr 20 Minuten 0,2 ccm Hp. (0,01/10) und 0,3 ccm 50proz. Rohrzuckerlösung (I). Maus 11,8 g, erhält 0,2 ccm Hp. und 0,3 ccm 0,9proz. NaCl (II), zugleich werden 5 bzw. 12 ccm 1proz. Blutkörperchenaufschwemmung zusammen mit 0,2 ccm Hp. und 0,3 ccm 50proz. Rohrzuckerlösung (a und b) bzw. mit 0,2 ccm Hp. und 0,3 ccm 0,9proz. NaCl versetzt (c und d). Die Tiere werden im Kohlenbogenlichte 1 Stunde belichtet und zeigen gleichmäßige Erscheinungen der Sensibilisation. In der Folge ist das Tier I etwas weniger subakut, beide Tiere werden aber am 6. Februar, 8 Uhr, tot gefunden. Allerdings ist hierbei zu berücksichtigen, daß sich die Giftwirkung des Rohrzuckers mit der des Hp. im Lichte addiert haben konnte.

---

[1]) l. c.
[2]) *W. Hausmann*, Wien. klin. Wochenschr. 1925, Nr. 12.

Die Blutproben wurden geteilt, ein Teil belichtet, ein Teil im Dunkeln belassen. Hierbei zeigte sich im Gegensatz zu den Sulfitversuchen eine stärkere Abschwächung bei den Blutproben, die unter Rohrzuckerzusatz mit der größeren Menge der Blutkörperchenemulsion versetzt worden waren. Während die belichteten Blutproben (c und d) nach 38 bzw. 55 Minuten hämolysiert waren, war im Gegensatz zu unseren sonstigen Erfahrungen die Lichtprobe von a nach 60 Minuten komplett hämolysiert, die von b erst ½ Stunde nach dem Aufhören der Bestrahlung stark hämolysiert.

V. Verhalten des Urethans bei Sensibilisation von Warmblütern.

Wir haben versucht, die Sensibilisationserscheinungen der mit Hp. vorbehandelten Tiere dadurch aufzuhalten, daß wir die Tiere in Urethannarkose bestrahlten. Diese Versuche wurden auch aus dem Grunde unternommen, um festzustellen, ob die im Verlaufe der akuten Sensibilisation eintretenden heftigen Reizerscheinungen an dem akut zum Tode führenden Vergiftungsbilde beteiligt sind oder nicht.

Es stellte sich nun heraus, daß man imstande ist, die akuten Reizerscheinungen seitens der Körperoberfläche, die bei der Belichtung von Hp.-Tieren auftreten, durch die Urethannarkose nahezu völlig zu unterdrücken, daß es aber in der Regel nicht gelingt, hierdurch die Spätfolgen der Sensibilisation zu vermeiden. Wir haben hier demnach den entgegengesetzten Fall, wie wir ihn bisher bei allen Desensibilisationsversuchen beobachtet hatten.

Bei allen anderen, bisher untersuchten Substanzen war kein durchgreifender Unterschied in den Reizerscheinungen der Hp.-Mäuse und der „desensibilisierten" Hp.-Mäuse im Lichte zu beobachten, wie ein Blick auf das in dieser Arbeit bisher Gesagte zeigt. Im Gegensatz hierzu werden bei der Urethannarkose in erster Linie die offenbar auf die Erregung sensibler Nervenendigungen zurückzuführenden Reizerscheinungen aufgehoben, die späteren Sensibilisationserscheinungen aber meist weniger gehemmt. In einem dieser Versuche fielen die von dem Tiere eingenommenen Körperstellungen auf.

Das mit Hp. und Urethan vorbehandelte Tier war bei Beginn der Bestrahlung somnolent, aber noch nicht in tiefer Narkose. Bald nach Beginn der Bestrahlung begab sich das bisher mit leicht ausgestreckten Extremitäten am Boden des Behälters liegende Tier in eine Stellung, die man am ehesten mit dem Sitzen eines Bären vergleichen kann. Das Tier saß in aufrechter Haltung, mit den Rücken an das Glasgefäß gelehnt. Ab und zu fuhr es sich mit der Pfote über die Schnauze, manchmal anscheinend traumhaftes Kratzen. Das Vergiftungsbild erinnerte etwas an den von *W. Hausmann*[1]) vor Jahren beschriebenen „Lichtschlag", der unter Verwendung großer Hp.-Mengen bei gleich-

[1]) Diese Zeitschr. **67**, 309, 1914.

zeitiger intensiver Belichtung der Mäuse erzielt worden war. „Sofort komatöser Eindruck, ab und zu Kratzversuche, die derart unterbrochen werden, daß die zum Kratzen erhobene Pfote in der Luft unbeweglich gehalten wird.“ Nur waren die hier auftretenden narkotischen Erscheinungen bei den Hp.-Mäusen durch die Lichtwirkung selbst zustande gekommen.

Der in dem obenerwähnten Urethanversuche am Tage nach der Belichtung eintretende Tod des Versuchstieres war vielleicht auf Rechnung der etwas zu großen Urethandosis zu setzen, deshalb wird nachfolgender Versuch mitgeteilt.

Maus a, 20 g, erhält am 23. Dezember 1924 0,2 ccm Hp. (0,01/10) und 0,3 ccm 10proz. Urethan, Maus b 0,2 ccm Hp. und 0,3 ccm 0,9proz. NaCl. a nach kurzer Zeit in Narkose. Beide Tiere bestrahlt von 17 Uhr 30 Minuten bis 18 Uhr 30 Minuten. a zeigt ab und zu Abwehrbewegungen und ganz spärliche Kratzversuche trotz der Narkose, b zeigt vom Beginn bis zum Ende der Bestrahlung heftigste Reizerscheinungen. Beide Tiere zeigen bei Abschluß der Belichtung deutliche Erscheinungen der subakuten Sensibilisation. Das Urethantier war bis 19 Uhr 30 Minuten in Narkose und erwachte nur langsam. Um 22 Uhr sind beide Tiere wach, b etwas stärker subakut als a. Am nächsten Morgen werden sie tot gefunden. Das totenstarre Tier b ist der Idealfall eines subakut verendeten Tieres, bei a Ödeme etwas geringer.

Die eben beschriebenen Narkoseversuche, die demnächst mit anderen narkotisierenden Substanzen wiederholt werden sollen, scheinen uns demnach zu sagen:

1. Die Reizerscheinungen, die bei Hp.-Tieren im Lichte auftreten, können durch Urethan weitgehend gehemmt werden. Die Urethannarkose hält jedoch bei den sensibilisierten Tieren die Lichtwirkung auf die Gewebe und in letzter Linie den Lichttod nicht auf.

2. Es können demnach am Lichttod sensibilisierter Mäuse Reizwirkungen, die auf Erregung sensibler Nerven beruhen, nicht wesentlich beteiligt sein.

Hierdurch wird die seinerzeit von *Hausmann* aufgeworfene Frage, ob es sich beim Sensibilisationstod um eine Schockwirkung handle, der die am ganzen Körper durch Jucken gequälten Tiere erliegen, verneint.

Zum Schlusse sei noch kurz bemerkt, daß mit Phenosafranin, dem von *Lüppo-Cramer*[1]) eingeführten Desensibilisationsmittel der photographischen Technik, nur anscheinend positive Resultate erhalten wurden, da in der von uns verwendeten Versuchsanordnung die Phenosafraninlösungen mit den Hp.-Lösungen Niederschläge ergaben.

[1]) *Lüppo-Cramer*, Negativ-Entwicklung bei hellem Lichte. Leipzig 1922.

Injizierte man zuerst das Phenosafranin und nach einiger Zeit an einer anderen Körperstelle die Hp.-Lösung, so wurde bisher keine Abschwächung der sensibilisierenden Wirkung erzielt.

Zusammenfassung.

1. Durch Serummengen, die in vitro die Lichtwirkung des Hämatoporphyrins sicher aufheben, konnten die bei Hämatoporphyrinmäusen im Lichte auftretenden Reizerscheinungen nicht verhindert werden, doch können bei geeigneter Versuchsanordnung die späteren Folgen der Sensibilisation hintangehalten werden.

2. Durch reduzierende Substanzen, die in vitro weitgehend gegen die sensibilisierende Wirkung des Hämatoporphyrins schützen, wurde die Reizwirkung bei weißen Mäusen nicht aufgehalten, auch die Spätfolgen nur in einigen Versuchen mit Natriumsulfit abgeschwächt.

3. Durch Kohlehydrate konnte bisher keinerlei Abschwächung der Gesamtsensibilisation von Warmblütern durch Hämatoporphyrin erzielt werden. In größerer Konzentration verabreicht, wirken Traubenzucker und Rohrzucker hochtoxisch auf weiße Mäuse.

4. Im Gegensatz zu diesen Erfahrungen werden durch Urethannarkose die Reizerscheinungen, die bei Hämatoporphyrintieren im Lichte auftreten, weitgehend gehemmt. Die Urethannarkose hält jedoch bei sensibilisierten Tieren die Lichtwirkung auf die Gewebe und in letzter Linie den Lichttod nicht auf.

Es können demnach am Lichttode sensibilisierter Mäuse Reizwirkungen, die auf Erregung sensibler Nerven beruhen, nicht wesentlich beteiligt sein.

Über die Einheitlichkeit des α-Lignins.

Von

Erik Hägglund.

(Aus dem chemischen Institut der Akademie Åbo.)

(Eingegangen am 20. März 1925.)

Von grundlegender Bedeutung für die Ligninforschung ist die Frage der Einheitlichkeit des Lignins. Schon früh wurde die Ansicht ausgesprochen, daß das Lignin aus verschiedenen Bestandteilen besteht. Damit steht auch die Auffassung von *H. Wislicenus*[1]) in Einklang, welcher meinte, daß das Lignin aus einer großen Anzahl kolloidaler Substanzen von unbekannter Konstitution zusammengesetzt war, eine Ansicht, die vielfach Anklang gefunden hat. Gegen diese Auffassung reagierte aber seinerzeit *Klason*[2]), welcher meinte, daß die Anzahl der Konstituenten nur gering sein könnte. Später wurde nachgewiesen, daß das Lignin der Fichte aus zwei verschiedenen Teilen bestand. Es zeigte sich nämlich, daß nur ein Teil der in Sulfitablauge vorhandenen Lignosulfonsäure durch Aussalzung abgeschieden werden konnte. Dieses Lignin wurde α-Lignin genannt. Die Menge von α-Lignin, auf die Gesamtmenge berechnet, betrug etwa zwei Drittel. Was nicht ausgefällt werden kann, hat den Namen β-Lignin bekommen.

Kürzlich sind neue Untersuchungen veröffentlicht worden, aus welchen der Schluß gezogen wurde, daß die β-Lignosulfonsäure nur ein Zersetzungsprodukt der α-Säure sei[3]). Bei dem Aufschluß von Holz mit schwefliger Säure bei niedriger Temperatur würde nur eine Lignosulfonsäure entstehen. Nach Untersuchungen, die wir anstellten, ist diese Behauptung unbegründet. Beleg dafür wird an anderer Stelle gegeben.

Außer den erwähnten Untersuchungen gibt es auch einige, die darauf hinauslaufen, daß die α-Lignosulfonsäure ebenfalls aus einer Mischung von verschiedenen Komponenten mit einer Zusammen-

---

[1]) Zeitschr. Chem. Kolloide **6**, 17, 87, 1910.

[2]) Arkiv för kemi **3**, Nr. 6.

[3]) *Dorée* und *Hall*, Journ. Soc. Chem. Ind. **43**, 257, 1924.; Cellulosechemie 5, 71, 1924.

setzung, die wenigstens zum Teil recht verschieden ist, besteht[1]). Andererseits wurde festgestellt, daß das aussalzbare Lignin aus einer Mischung von verschiedenen Substanzen mit sehr ähnlicher Zusammensetzung und Eigenschaften bestand[2]).

Dagegen hebt *Klason*[3]) auf Grund neuer Untersuchungen hervor, daß die α-Lignosulfonsäure einheitlich ist mit der Zusammensetzung $C_{20}H_{21}O_6SO_2OH$. Wenn die Lauge während längerer Zeit gestanden hat, oder die Farbe nicht rein gelb ist, wird die Lignosulfonsäure zersetzt, und man bekommt Sulfosäuren mit verschiedener Zusammensetzung. Durch fraktionierte Fällung mit Kochsalz und Überführung der ausgefällten sulfosauren Salze in β-Naphthylaminverbindungen wurden Substanzen mit derselben Zusammensetzung erhalten. Aus einer Sulfitablauge, die durch Aufschluß von Holz bei 100° erhalten worden war, wurde ebenfalls eine Naphthylaminverbindung dargestellt, die dieselbe Zusammensetzung wie die anderen Präparate zeigte.

Es geht aus dem gegebenen Überblick hervor, daß die Ansichten völlig auseinandergehen, ob das α-Lignin einheitlich ist oder nicht. Um die Frage nochmals zu prüfen und die Unstimmigkeiten aufzuklären, hat der Verfasser es für wünschenswert gehalten, neue Versuche anzustellen.

Dabei wurde zunächst aus Laugen, die bei verschiedener Kochdauer erhalten wurden, die α-Lignosulfonsäure als β-Naphthylaminverbindung in saurer Lösung ausgefällt und analysiert. Ferner wurden aus einer und derselben Lauge durch fraktionierte Fällung mehrere Produkte dargestellt und analysiert. Über die Ergebnisse wird im experimentellen Teil näher berichtet.

Experimenteller Teil.

Versuchsreihe 1.

400 ccm Sulfitablauge, von einer 13stündigen Kochung frisch entnommen, wurden mit Kalk neutralisiert und filtriert. Nachher wurde die Lauge schwach angesäuert und auf etwa 100 ccm eingeengt. Zu der Lauge wurde salzsaures β-Naphthylaminchlorhydrat langsam zugesetzt, bis die Ausfällung vollständig war. Die Fällung wurde abfiltriert und so lange mit eiskaltem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser keine Chlorreaktion mehr gab (Präparat I).

Dasselbe Verfahren wurde mit Laugen, die bei derselben Kochung 15, 17, 18 und 20 Stunden behandelt waren, angestellt. In der Weise

[1]) *Hönig* und *Spitzer*, Monatshefte 1917; *Hönig* und *Fuchs*, ebendaselbst 1920.

[2]) *Melander*, Cellulosechemie **2**, 69, 1921.

[3]) Svensk Kemisk Tidskrift 1922.

wurden weitere vier verschiedene Präparate (II bis V) erhalten. Die Farbe der betreffenden Laugen ist unten angegeben.

Die Substanzen wurden zuerst im Vakuumexsikkator und darauf im Trockenschrank bei 95° zum konstanten Gewicht getrocknet. Der Aschengehalt war in den Präparaten etwa 0,9 Proz. Die Bestimmung von Kohlenstoff und Wasserstoff geschah wie üblich durch Verbrennung unter Anwendung von Bleichromat, auch mit der Substanz gemischt. Der Stickstoff wurde nach *Dumas* und der Schwefel nach *Carius* ermittelt.

Prozent				Prozent			
C	H	S	N	C	H	S	N
Präparat I (13 Stunden).				Präparat IV (18 Stunden).			
63,0	5,3	5,0	2,3	64,5	5,3	5,7	—
62,5	5,3	5,35	—	62,2	5,4	6,0	—
63,2	5,2	—	—	64,0	—	—	—
Präparat II (15 Stunden).				Präparat V (20 Stunden).			
64,0	5,4	5,0	2,2	62,3	5,0	6,4	—
64,3	5,2	5,15	2,2	63,4	5,3	6.0	—
63,0	5,4	—	—	63,4	5,3	—	—
Präparat III (17 Stunden).							
62,3	4,9	5,25	2,25				
63,7	4,9	—	2,30				
62,8	5,2	—	—				

Zusammenfassung der Versuchsreihe 1.
(Durchschnittszahlen.)

Präparat	Laugenfarbe	„Disponibles Sulfit" in der Lauge	Kochzeit Stdn.	Prozent C	H	S	N
I	hellgelb	vorhanden	13	63,0	5,3	5,2	2,3
II	gelb	„	15	63,8	5,3	5,1	2,2
III	braun	verbraucht	17	62,8	5,0	5,3	2,25
IV	dunkelbraun	„	18	63,6	5,4	5,8	—
V	schwarz	„	20	63,0	5,2	6,2	—

Versuchsreihe 2.

Bei dieser Versuchsreihe stammten die Laugen von einer Kochung, bei welcher die Kochsäure eine andere war als im vorigen Versuch, was aus folgenden Zahlen hervorgeht.

	Gramm pro 100 ccm Lauge		Gramm pro 100 g Holz	
	CaO	Gesamt-SO_2	CaO	Gesamt-SO_2
Versuchsreihe 1 . . .	1,01	6,03	5,05	30,15
„ 2 . .	0,70	4,13	3,5	20,65

Wie im vorigen Versuch, wurden die Laugen bei verschiedenen Stadien der Kochung genommen. Die Ausfällung mit β-Naphthylaminchlorhydrat geschah diesmal in einer wesentlich konzentrierteren Lösung. Vor der Ausfällung wurde die Lauge mit Bariumchlorid versetzt, worauf filtriert wurde. Im übrigen wurde dieselbe Arbeitsweise wie in der vorhergehenden Versuchsreihe benutzt. Die erhaltenen Präparate werden hier mit VI bis X bezeichnet.

Aus dem Filtrat der Naphthylaminfällung, das zuerst ganz klar war, schied sich nach etwa 3 Wochen noch etwas Substanz aus, die abfiltriert, getrocknet und gewogen wurde. Das wurde ebenfalls in dem Filtrat von VI nach weiteren 5 Wochen wiederholt. Bestimmungen von Schwefel zeigten, daß es sich um dieselbe Substanz, die zuerst ausfiel, handelte.

Zum Verständnis folgender Zahlen sei erwähnt, daß in den Kochversuchen 30 g absolut trockenes Holz von 1000 ccm Lauge entsprochen wird. Unter der Annahme, daß die Fällungsreaktion nach folgendem Schema von *Klason* verläuft, nämlich

$$C_{20}H_{21}O_6SO_3H + C_{10}H_7NH_2 - H_2O,$$

können folgende Ligninausbeuten berechnet werden.

Präparat	Anzahl ccm Lauge vor der Eindampfung	β-Naphthylaminfällung A. sogleich ausgefällt	B. nach 3 Wochen	C. nach weiteren 5 Wochen	Summe	Der Fällung entsprech. Menge Lignin g	α-Lignin, Proz. des Holzes
VI . .	500	3,989	0,265	0,243	4,497	2,84	18,9
VII . .	600	5,204	0,373	—	5,557	3,52	19,6
VIII .	500	4,140	0,386	—	4,526	2,86	19,0
IX . .	600	5,697	0,261	—	5,958	3,76	20,9
X . . .	600	5,607	0,428	—	6,032	3,81	21,2

Analysen:

Prozent C	H	S	N	Prozent C	H	S	N
Präparat VI.				Präparat IX.			
62,6	5,3	5,3	2,4	65,2	4,8	5,8	2,3
63,6	4,6	5,2	2,2	64,2	4,7	5,7	2,3
63,6	5,2	—	—	Präparat X.			
Präparat VII.				62,0	4,6	5,9	1,7
64,2	5,5	5,3	2,4	62,2	4,8	6,0	1,6
64,2	5,3	5,4	2,3				
63,6	5,2	—	—				
Präparat VIII.							
63,0	5,3	5,5	2,4				
63,5	5,6	5,7	2,2				

Zusammenfassung der Versuchsreihe 2.
(Durchschnittszahlen.)

Präparat	Laugenfarbe	„Disponibles Sulfit" in der Lauge	Kochzeit Stdn.	Prozent C	H	S	N
VI	dunkelgelb	verbraucht	15	63,3	5,1	5,25	2,3
VII	hellbraun	„	16	64,0	5,3	5,35	2,35
VIII. . . .	braun	„	17	63,2	5,4	5,6	2,3
IX	dunkelbraun	„	18	64,9?	4,8	5,75	2,3
X	braunschwarz	„	19	62,1	4,7	5,95	1,65

Versuchsreihe 3.

In diesem Falle wurde eine Ablauge einer Sulfitfabrik (Lielahti Finnland) benutzt. Eine größere Menge davon wurde mit Kalk neutralisiert und filtriert. Die Lauge wurde darauf mit Kochsalz gesättigt, der Niederschlag abfiltriert und in wenig Wasser gelöst. Die Lösung wurde dreimal nacheinander mit Alkohol gefällt. Die Niederschläge waren zuerst schleimig, aber nach Dekantierung und Waschung mit Alkohol war es möglich, sie in leicht filtrierbare Form zu bringen. Jede Fällung wurde in wenig Wasser gelöst und mit β-Naphthylaminchlorhydrat in saurer Lösung gefällt. Die Naphthylaminverbindungen wurden unter schwacher Erwärmung in Alkohol gelöst und mit Äther gefällt, filtriert und getrocknet. Die Präparate (Ia, IIa, IIIa) wurden auf Stickstoff, Schwefel und Gehalt an Methoxyl analysiert. Der Aschengehalt betrug 0,6 Proz. und hatte auf die Ergebnisse der Analyse wenig Einfluß. Die Bestimmung des Methoxyls geschah nach *Benedikt* und *Bamberger* mit Apparat nach *Stritar*. Da die Präparate schwefelhaltig sind, wurde in bekannter Weise vor dem Silbernitratgefäß eine Waschflasche mit 10proz., mit Schwefelsäure schwach angesäuerter Cadmiumsulfatlösung eingeschaltet.

Präparat	Prozent N	S	CH_3O
Ia	2,4	5,1	9,6
IIa	2,3	5,07	10,4, 9,65
IIIa	2,2	5,18	9,45

Versuchsreihe 4.

Eine größere Menge derselben Lauge wie in der Versuchsreihe 3 wurde mit $BaCl_2$ versetzt. Ohne den Niederschlag abzufiltrieren, wurde unter Erwärmung zu 60 bis 70° und Umrührung geschlämmte Kreide zugesetzt, worauf abfiltriert wurde. Die klare Lösung wurde mit Kochsalz gesättigt, der Niederschlag abfiltriert und mit gesättigter Kochsalzlösung gewaschen. Die Fällung wurde darauf in Wasser gelöst

und die Lösung filtriert. Aus letzterer wurden durch Zusatz von konzentrierter Salzsäure drei Niederschläge in Fraktionen aufgenommen. Die Fällungen wurden in Wasser gelöst und wiederum mit konzentrierter Salzsäure gefällt. Die Fällungen wurden abzentrifugiert, in Wasser gelöst, worauf mit β-Naphthylaminchlorhydrat gefällt wurde. Die Niederschläge wurden abfiltriert und in zwei etwa gleiche Teile geteilt. Der eine wurde unter Erwärmung in Alkohol gelöst. Aus der Lösung wurde durch Zusatz von Äther die Naphthylaminverbindung ausgefällt, filtriert, mit Äther gewaschen und zur Gewichtskonstanz bei 95° getrocknet. Die andere Hälfte wurde im Vakuumexsikkator getrocknet. Das Präparat war nachher in Alkohol fast unlöslich geworden, worauf schon *Klason* aufmerksam gemacht hat. Die Substanz wurde mit Alkohol gerieben und getrocknet. In dieser Weise wurden sechs Präparate erhalten, die auf Stickstoff, Schwefel und Methoxyl analysiert wurden.

Fraktion	Prozent			Fraktion	Prozent		
	N	S	CH_3O		N	S	CH_3O
1a	1,7	5,0	12,7	2b	1,7	5,1	12,4
1b	1,7	4,7	—	3a	1,6	5,1	12,7
2a	1,7	4,9	12,6	3b	1,7	5,0	12,6

Es geht aus diesen Zahlen hervor, daß die einzelnen Präparate dieselbe Zusammensetzung haben. Im Vergleich mit den Präparaten der Versuchsreihe 3 ist ein deutlicher Unterschied vorhanden, vor allen Dingen betreffend des Stickstoff- und Methoxylgehalts. Das kann wohl kaum anders gedeutet werden, als daß unter dem Einfluß der starken Salzsäure eine weitgehende Assoziation der Ligninmoleküle eingetreten ist. Nach Feststellungen von *Klason* neigt die Lignosulfonsäure leicht zur Assoziation. Diese Frage muß näher untersucht werden.

Versuchsreihe 5.

300 ccm Lauge, die während mehrerer Monate gestanden hatten, wurden, wie in der Versuchsreihe 1, mit β-Naphthylaminchlorhydrat gefällt. Die Ausbeute war diesmal wesentlich geringer, entsprach 12 Proz. des Holzgewichts. Die Zusammensetzung war offenbar unverändert, wie aus folgenden Zahlen hervorgeht:

$$S = 5{,}0, \quad 5{,}1 \text{ Proz.}; \qquad N = 2{,}28, \quad 2{,}35 \text{ Proz.}$$

Versuch A.

In die Lauge wurde schweflige Säure eingeleitet, bis der Gehalt davon etwa 4 Proz. betrug. Ein Teil der Lauge wurde auf 135° während 6 Stunden erhitzt. Nach der Erhitzung wurde eine gewisse Menge

Lauge mit β-Naphthylaminchlorhydrat gefällt. Ausbeute in Prozent des Holzgewichts an gefälltem Lignin: 8,8 Proz. Der Schwefelgehalt betrug 6,85, 6,90 Proz.

Versuch B.

Der Versuch wurde wie A ausgeführt. Ausbeute an gefälltem Lignin: 9,0 Proz. Die Analyse der Naphthylaminverbindung ergab

S = 7,35 Proz.; N = 3,47, 3,54 Proz.

Versuch C.

Ausbeute an gefälltem Lignin: 10,3 des Holzgewichts. Analyse der Naphthylaminverbindung:

S = 7,06 Proz.; N = 2,87, 3,88 Proz.

Aus diesen Versuchen ergibt sich, daß während der Erhitzung beträchtliche Mengen von schwefliger Säure von der Lignosulfonsäure aufgenommen worden sind, wobei aber vermutlich eine teilweise Zersetzung eingetreten ist.

Bei den vorliegenden experimentellen Untersuchungen wurde ich von Herrn *Hans v. Koskull* unterstützt.

Untersuchungen über die Einwirkung von Na_2CO_3 auf Keimung und Wachstum der Pflanzen. I.

Von

D. Fehér und **St. Vági.**

(Aus den botanischen und forstlich-chemischen Instituten der k. ungar. Hochschule für Berg- und Forstingenieure in Sopron.)

(Eingegangen am 23. März 1925.)

Die Gesamtfläche der gänzlich unfruchtbaren Alkaliböden in Osteuropa (Rußland und Ungarn) und im südlichen Teile der Vereinigten Staaten erreicht beträchtliche Dimensionen. Allein im heutigen Ungarn beträgt die Gesamtfläche der größtenteils unfruchtbaren Alkaliböden fast 500000 Katastraljoch. Es leuchtet ohne weiteres ein, daß die Nutzbarmachung dieser Landflächen heute den Gegenstand von eingehenden Versuchen bildet, wozu außer den landwirtschaftlichen Nutzpflanzen auch forstliche Gewächse hinzugezogen werden (1). Wir befassen uns seit Frühjahr 1923 eingehend mit dem biochemischen Teile dieser überaus wichtigen Frage, und die vorliegenden Untersuchungen stellen die Ergebnisse unserer diesbezüglichen Versuche dar. Der Gedankengang, der uns bei der Behandlung dieser Frage leitet, ist kurz der folgende:

1. Von einer entsprechenden Nutzbarmachung und dieser vorangehenden Aufbesserung dieser Böden kann erst dann die Rede sein, wenn zuerst jene physiologischen Faktoren, welche das Pflanzenwachstum dieser Böden unmöglich machen, isoliert nach ihren Wirkungen, qualitativ und quantitativ untersucht werden.

2. Wenn das biochemische und pflanzenphysiologische Verhalten der fraglichen Faktoren restlos aufgeklärt wird, kann die Eliminierung der schädlichen Einwirkung dieser Stoffe in Verbindung mit praktischen Versuchen in Angriff genommen werden. Abgesehen von den schlechten physikalischen Eigenschaften dieser Böden, die ja hauptsächlich durch die chemische Konstitution verursacht werden, ist hauptsächlich der Gehalt von Na_2CO_3 jener Faktor, dessen Einwirkung die land- und forstwirtschaftliche Nutzbarmachung vorderhand unmöglich macht.

Bezüglich der eventuellen schädlichen Wirkung des Nitritgehalts haben wir bereits nachgewiesen (11), daß jene Mengen, welche in diesen Böden vorkommen, auch in maximo überhaupt keinen schädlichen Einfluß ausüben, sogar, wie unsere neuen Untersuchungen, über deren Resultate wir in einer anderen Mitteilung berichten werden, zeigen, eher stimulierend wirken.

Der Sodagehalt schwankt gewöhnlich zwischen 0,5 bis 1,0 Proz. Bei unseren Versuchen haben wir den Konzentrationsgrad gewöhnlich zwischen diesen Grenzen gewählt. Na_2CO_3, als Salz einer starken Base mit einer schwachen Säure, wirkt im Sinne des chemischen Massenwirkungsgesetzes in wässeriger Lösung stark alkalisch, da nach der Gleichung

$$Na_2CO_3 + 2\,H_2O = 2\,NaOH + CO_2 + H_2O$$

hydrolytisch gespalten wird, und die entwickelte Natronlauge im Gegensatz zu der frei werdenden Kohlensäure stark elektrolytisch dissoziiert und die Lösung alkalische Reaktion zeigen wird. Dementsprechend haben wir unsere ersten Keimungsversuche im destillierten Wasser ausgeführt, um die schädliche Wirkung der frei werdenden OH-Ionen in voller Wirksamkeit beobachten zu können.

Die Keimungsversuche sind teils in großen viereckigen Porzellanschalen auf eingelegten, mit Organtüll überzogenen Holzrahmen, teils in runden Glasgefäßen mit ebenfalls Organtüll überzogenen und einlegbaren Glasringen durchgeführt. Die Versuche fanden im Gewächshause statt, das allmählich verdunstende Wasser wurde, um die Konzentration immer konstant halten zu können, regelmäßig ersetzt. Die Länge der Versuchspflanzen wurde nach genauer Messung an jedem einzelnen Individuum gemessen und sodann das arithmetische Mittel gebildet.

Die Versuche mit festen Böden haben wir teils in breiten zylindrischen Glasgefäßen, teils in großen Töpfen durchgeführt. Der Sodagehalt dieser Böden wurde dadurch gleichmäßig verteilt, daß wir die erforderliche Sodamenge in Form von wässerigen Lösungen zugegeben haben. Die verwendeten Samen waren von gleicher Herkunft und gleicher Qualität.

Die erste Versuchsreihe umfaßt Getreidesamen und Samen von Holzpflanzen, welche bei der Aufforstung dieser Böden hauptsächlich in Betracht kommen.

Die Resultate sind unter 1, Tabelle I, auf Grund der Versuchsprotokolle dargestellt. Es hat sich ganz deutlich gezeigt, daß bei einem Sodagehalt von 0,4 und 0,5 Proz. Keimung und Wachstum stark gehemmt werden, so daß bei einer Konzentration von 0,5 Proz. von einem Pflanzenwachstum praktisch kaum mehr die Rede sein kann.

Tabelle I. Übersicht über die Resultate der Versuchsreihen.

1. I. Versuchsreihe. Keimungsversuche mit Getreidesamen in Porzellanschalen. (Destilliertes Wasser.)

Nummer der Gefäße:				1		2		3		4		5		6		7		
Stärke der Lösung von Na_2CO_3 in Proz.:				0		0,05		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5		
				Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		
Pflanzenart	Versuchsdauer Tage	Mittlere Versuchstemp. °C	Zahl der Samen pro Gefäß	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Anmerkung
Weizen	30	21,5	97	14,1	41	14,8	41	13,8	25	14,1	29,3	2,6	6,6	3,1	4,6	4,1	3,3	—
Gerste	30	21,5	97	14,6	37,6	11,1	23,6	13	26	7,8	20	11	14	4,5	5,3	2,3	5,6	—
Roggen	30	21,5	97	14,6	81,3	15	60	14,5	57	11,8	45	6,5	21,6	7	18	2,8	11	—
Hafer	30	21,5	97	14,3	69,6	13	61	12,1	53	8,1	31	4,1	3	1,8	2,5	0	0	—
Mittel:	30	21,5	97	14,4	48,1	14,5	46,6	14,4	40	10,6	31,4	6,0	11,3	4,1	7,6	2,3	5	—

2. II. Versuchsreihe. Keimungsversuch mit Samen von Holzpflanzen in Glasgefäßen. (Destilliertes Wasser.)

Nummer der Gefäße:				1		2		3		4		5		6		7		
Stärke der Lösung von Na_2CO_3 in Proz.:				0		0,05		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5		
				Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		
Pflanzenart	Versuchsdauer Tage	Mittlere Versuchstemp. °C	Zahl der Samen pro Gefäß	Zurückgeblieben	Keimproz.	Zurückgeblieben	Keimproz.	Zurückgeblieben	Keimproz.	Zurückgeblieben	Keimproz.	Zurückgeblieben	Keimproz.	Zurückgeblieben	Keimproz.	Zurückgeblieben	Keimproz.	Anmerkung
Pinus silvestris . .	24	21,5	100	75,5	24,5	93	7	98	2	100	0	100	0	99	1	100	0	Mittel von 2 Versuchen
Pinus nigra	21,5	21,5	100	73,5	26,5	77	23	92	8	97	3	91	9	97	3	97	3	Mittel von 2 Versuchen
Ailanthus glandulosa	34	21,5	100	45	55	62,5	37,5	88,4	11,6	93,4	6,6	98,4	1,6	100	0	100	0	Mittel von 2 Versuchen
Robinia pseudacacia	12	21,5	100	83	17	86	14	89	11	99	1	100	—	100	0	100	0	Mittel von 2 Versuchen
Mittel:	22,9	21,5	100	69,2	30,7	79,6	20,4	89,3	8,1	97,3	2,65	97,3	2,65	93,1	1	99	0,75	

Tabelle 11.

3. III. Versuchsreihe. Getreidepflanzen im humusarmen Sandboden. Tongefäße.

Nummer der Gefäße				1		2		3		4		5		6		7		
Stärke der Lösung von Na_2CO_3 in Proz.:				0		0,05		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5		
				Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		
Pflanzenart	Versuchsdauer Tage	Mittlere Versuchstemp. °C	Zahl der Samen pro Gefäß	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchsch. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Anmerkung
Gerste	25	21,5	25	9,5	92	12	92	10	84	10,5	88	12,2	80	12,8	84	7	80	—
Hafer	25	21,5	25	9,5	92	12,3	88	11,7	92	11,7	80	10	80	12,3	80	12	76	—
Weizen	25	21,5	25	12	88	8,2	80	11	80	11	80	13,5	84	13	76	12,5	68	—
Mittel:	25	21,5	25	10	90	10,8	86,6	10,9	85,3	11	82,6	11,9	81	12,7	80	10,5	74,6	—

4. IV. Versuchsreihe. Holzpflanzen im humusarmen Sandboden in Tongefäßen.

Acer negundo . . .	123	21,5	40	6	65	7,5	40	7	27,5	4	10	3,5	10	3,5	7,5	2	2,5	—
Fraxinus excelsior .	123	21,5	40	8,5	12,5	5	10	5	17,5	8,5	17,5	7	17,5	8,5	15	7	12,5	—
Mittel:	123	21,5	40	7,25	38,7	6,25	25	6,0	22,5	6,25	13,7	5,25	13,7	6,0	11,25	4,5	7,5	—

5. V. Versuchsreihe. Versuch zur Bestimmung der Vegetationsgrenze im humusarmen Sandboden. Glasgefäße.

Nummer der Gefäße:				1		2		3		4		5		6		7		
Stärke der Lösung von Na_2CO_3 in Proz.:				0		0,05		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5		
				Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		
Pflanzenart	Versuchsdauer Tage	Mittlere Versuchstemp. °C	Zahl der Samen pro Gefäß	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Durchschn. Länge	Ausgekeimt Proz.	Anmerkung
Weizen	32	21,5	50	22	98	10,5	96	20	92	16,5	92	16	92	17,5	88	15,5	76	[illegible]

Nummer der Gefäße:				8		9		10		11		12		13		14		
Stärke der Lösung von Na_2CO_3 in Proz.:				0,7		1,0		1,5		2,0		3,0		3,5		4,0		
Pflanzenart	Versuchsdauer	Mittlere Versuchstemp.	Zahl der Samen pro Gefäß	Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Anmerkung
				Durchschn. Länge	Ausgekeimt	Durchschn. Länge	Ausgekeimt	Durchschn. Länge	Ausgekeimt	Durchschn. Länge	Ausgekeimt	Durchschn. Länge	Ausgekeimt	Durchschn. Länge	Ausgekeimt	Durchschn. Länge	Ausgekeimt	
	Tage	°C			Proz.		Proz.		Proz.		Proz.		Proz.		Proz.		Proz.	
Weizen	32	21,5	50	18	64	1,5	8	1,0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	—

6. VI. Versuchsreihe. Holzpflanzen im humusarmen Sandboden. Tongefäße.

Nummer der Gefäße:				1		2		3		4		5		6		7		
Stärke der Lösung von Na_2CO_3 in Proz.:				0		0,05		0,1		0,2		0,3		0,4		0,5		
Pflanzenart	Versuchsdauer	Mittlere Versuchstemp.	Zahl der Samen pro Gefäß	Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Erfolg:		Anmerkung
				Durchschn. Länge	Ausgekeimt	Durchschn. Länge	Ausgekeimt	Durchschn. Länge	Ausgekeimt	Durchschn. Länge	Ausgekeimt	Durchschn. Länge	Ausgekeimt	Durchschn. Länge	Ausgekeimt	Durchschn. Länge	Ausgekeimt	
	Tage	°C			Proz.		Proz.		Proz.		Proz.		Proz.		Proz.		Proz.	
Ailanthus glandulosa	168	21,5	26	7,2	33	10,8	34	7	21,3	11,6	22,3	14,3	20	14,5	24	5,8	6,6	Mittel v. 3 Vers.
Pinus nigra	260	21,5	50	7,5	24	6,5	22	6,5	14	6,5	10	6	2	0	0	0	0	1 Versuch
Pinus silvestris . .	250	21,5	30	6	22	5,5	30	7	13	2	33	0	0	0	0	0	0	1 Versuch
Robinia pseudacacia	213	21,5	35	9,5	41	7,8	28	4,6	33	5,5	14,6	6	10,6	6,6	8	2,8	7,3	Mittel v. 3 Vers.
Mittel:	222	21,5	35	7,5	30	7,6	28,5	6,2	20,3	6,4	19,9	6,5	8,1	5,2	8	2,1	3,4	

7. VII. Versuchsreihe. Holzpflanzen im humusreichen Gartenboden. Tongefäße.

Acer negundo . . .	73	21,5	40	6,9	65,8	3,6	61	14	58,5	12,5	31	11,8	34,5	10,3	36,2	13,3	33,5	
Ailanthus glandulosa	120	21,5	23	9,6	30,6	8,8	26	9,3	39,2	7,3	33,6	6	8,6	5,6	19	6,6	14,6	Mittel v. 3 Vers.
Fraxinus excelsior .	134	21,5	39	14,5	19	18,2	22,5	15,2	18,5	16,2	60	14,2	26	14,5	15,4	9	13,5	„ „ 2 „
Pinus nigra	175	21,5	33	6,3	46,6	5,2	38,6	5	26	3,2	12	2,3	4	4,1	6,6	0	0	„ „ 3 „
Pinus silvestris . .	182	21,5	41	4,4	21,6	1,6	16	3,9	12	2,9	11,2	3,2	8,2	0,5	1,5	0,7	3,6	„ „ 5 „
Robinia pseudacacia	103	21,5	45	7,7	41	7,7	27,4	5	29,7	5,6	25,1	6,9	20,1	5,8	9,7	3,1	3,2	„ „ 7 „
Mittel:	131	21,5	37	8,2	37,4	7,5	33,6	8,7	30,6	7,9	28,8	7,4	17	6,8	14,7	5,5	11,4	

Bei diesen starken Dosen konnte ganz deutlich beobachtet werden, daß bei den Konzentrationen von 0,4 und 0,5 Proz. die Wurzelspitze bald abgestorben war, sie nahm eine braune Farbe an und die mikroskopische Beobachtung zeigte, daß eine fast völlige Gewebsorganisation eintrat.

Noch deutlicher konnte die Giftwirkung an der Keimung der Holzpflanzen nachgewiesen werden (2, Tabelle I). Besonders empfindlich war Pinus silvestris, während die nahe verwandte Schwarzkiefer eine ganz erstaunliche Widerstandskraft gezeigt hat.

Es hat sich im allgemeinen gezeigt, daß die untersuchten Holzpflanzen im Verhältnis zu den Getreidepflanzen gegen die schädliche Einwirkung von Na_2CO_3 viel empfindlicher sind.

Die Absorption von Na_2CO_3 ist dabei ziemlich gering. Bei einem diesbezüglichen Orientierungsversuch, der am 30. Dezember 1924 mit 0,3 Proz. Na_2CO_3-Gehalt in Gang gesetzt wurde, wurden 50 Stück Weizenpflanzen auf Filterpapier in Jenenser Glasgefäßen in 940 ccm destillierten Wassers gelegt, das 55,5 ccm einer Na_2CO_3-Lösung, die pro Kubikzentimeter 0,0506 g Na_2CO_3 enthielt, zugesetzt wurde.

Nach 14 Tagen waren 38 Samen ausgekeimt, die Keimlinge durchschnittlich 2 cm lang, so daß die Gesamtabsorption

55,5 ccm
55,4 „
00,1 ccm Lösung

oder 0,00506 g Na_2CO_3 war.

Es entfallen daher auf jeden Keimling

$$0{,}00506 : 38 = 0{,}00013 \text{ g } Na_2CO_3.$$

Da die durchschnittliche Länge des Kontrollversuchs 4 cm war, so genügte diese kleine Menge, um das Wachstum fast auf die Hälfte herabzudrücken.

Bei der dritten Versuchsreihe (s. Tabelle II) haben wir das Wachstum von Getreidepflanzen im Quarzsand untersucht.

Die Versuche waren in Blumentöpfen derart durchgeführt, daß die Verteilung des Na_2CO_3 nach Gewichtsprozenten des Versuchsbodens bestimmt wurde. Um eine gleichmäßige Verteilung des Salzes erreichen zu können, haben wir die erforderliche Salzmenge der Erde in wässeriger Lösung zugesetzt. Die untere Öffnung der Töpfe wurde verstopft, und das Begießen wurde täglich mit destilliertem Wasser vorgenommen.

Zur Feststellung der Konzentrationsgrenzen, bei der die Keimung und das Wachstum vollständig gehemmt wird, wurde Versuch 78 (Tabelle V) in Glasgefäßen, ebenfalls in Quarzsand, angestellt. Das

Resultat zeigt ganz deutlich, daß bei einer Gewichtskonzentration von 1,5 Proz. Na_2CO_3 Keimung und Wachstum vollkommen unterbleiben.

Zum Vergleich haben wir auch einige Holzpflanzen herangezogen, die im mageren Sandboden gezogen wurden.

Versuchsreihe IV und VI zeigt die Resultate. Vergleicht man diese Resultate mit den Ergebnissen der dritten Versuchsreihe, so sieht man ohne weiteres, daß die Holzpflanzen gegen den Sodagehalt des Bodens viel empfindlicher sind als die Getreidepflanzen. Verhältnismäßig befriedigend war die Haltung der Robinia und Ailanthus glandulosa.

Übereinstimmend mit den Keimversuchen der Versuchsreihe 2 ist bei 0,4 bis 0,5 Proz. Sodagehalt die Keimung und das Wachstum dieser Pflanzen als vollkommen verhindert anzusehen.

Bei der Versuchsreihe 5 haben wir zur Orientierung die Wirkung des Humusgehalts des Bodens auf den Na_2CO_3-Gehalt des Bodens untersucht. Zum Gegenstand dieser Versuche wählten wir wieder Holzpflanzen, weil die Empfindlichkeit derselben gegen den Sodagehalt aus den Resultaten der Versuchsreihe IV und VI klar hervortritt.

Die Resultate zeigen nun die Tatsache, daß der Humusgehalt des Sandbodens die schädlichen Eigenschaften des Sodagehalts stark verändert. *Pinus silvestris*, *Pinus nigra* und *Acer negundo*, die im sandigen, humusreichen Boden bei 0,3 bzw. 0,4 Proz. Na_2CO_3 vollkommen versagt haben, zeigen im humusreichen Boden bei 0,4 Proz. Na_2CO_3 noch positive Resultate. Vergleicht man die Keimprozente jener Pflanzen, die in den Versuchsreihen im sandigen, humusarmen Waldboden und humusreichen Boden vorkommen, so bekommt man folgende Übersicht:

		0 Proz.	0,05 Proz.	0,1 Proz.	0,2 Proz.	0,3 Proz.	0,4 Proz.	0,5 Proz.
Acer negundo	Humusarmer Sandboden	65	40	27,5	10	10	7,5	2,5
	Humusboden	65,8	61	58,5	31	34,5	36,2	33,5
Ailanthus glandulosa	Humusarmer Sandboden	33	34	31,3	22,3	20	24	6,6
	Humusboden	30,6	26	39,3	33,6	8,6	19	14,6
Pinus nigra	Humusarmer Sandboden	24	22	14	10	2	0	0
	Humusboden	46,6	38,6	26	12	4	6,6	0
Pinus silvestris	Humusarmer Sandboden	22	30	13	33	0	0	0
	Humusboden	21,6	16	12	11,2	8,2	1,5	3,6
Robinia pseud.	Humusarmer Sandboden	41	28	33	14,6	10,6	8	7,3
	Humusboden	41	27,4	29,7	25,1	20,1	9,7	3,2

Vergleicht man nun zur Orientierung die Mittel der Keimprozente der einzelnen Versuchsreihen, so gestaltet sich die Übersicht folgendermaßen:

Keimprozente:	0	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5
Destilliertes Wasser I. Getreidepflanzen	48,1	46,6	40	31,4	11,3	7,6	5
Destilliertes Wasser II. Holzpflanzen	30,7	20,4	8,1	2,6	2,6	1,0	0,75
Humusarmer Sandboden III. Getreidepflanzen	90	86,6	85,3	82,6	8,1	80	74,6
Humusarmer Sandboden IV. Holzpflanzen	38,7	25	22,5	13,7	13,7	11,25	7,5
Humusarmer Sandboden V. Holzpflanzen	30	28,5	20,3	19,9	8,1	8	3,4
Humusreicher Boden VI. Holzpflanzen	37,4	33,6	30,6	28,8	17	14,7	11,4

Die Ergebnisse der fünften Versuchsreihe sind hauptsächlich für die Verwendung von Holzpflanzen von Wichtigkeit. Sie zeigen nämlich ganz klar, daß der Humusgehalt, namentlich der Gehalt an Humussäuren, die schädliche Wirkung der bei der Hydrolyse des Na_2CO_3 frei werdenden OH-Ionen deutlich herabmindern kann. Gelingt es daher dem Walde, an den Alkaliböden festen Fuß zu fassen, so wird die humusbildende Eigenschaft der Waldstreu bald die Aufbesserung dieser Böden herbeiführen. Die große Schwierigkeit beruht jedoch auf dem Umstande, daß gerade die Holzpflanzen viel größere Empfindlichkeit zeigen als die Getreidepflanzen und daher die Aufforstung bei einem Konzentrationsgrad von 0,4 bis 0,5 aus physiologischen bzw. biochemischen Gründen sehr schwierig wird.

Die jetzt veröffentlichten Versuche betrachten wir als erste Orientierung, deren hauptsächlichste Resultate sich kurz folgenderweise zusammenfassen lassen.

1. *Die Verbindung* Na_2CO_3 *ist als Pflanzengift zu betrachten, dessen volle Wirkung bei vollständiger Lösung und der darauf folgenden vollen Ionisation der frei werdenden* $NaOH$ *zur Geltung kommt. Die Giftwirkung ist daher hauptsächlich dem Überschuß von OH-Ionen zuzuschreiben.*

2. Entsprechend dem in Punkt 1 gesagten: Sodalösungen, welche die Gewichtskonzentrationen von 0,4 bis 0,5 Proz. überschreiten, können die Keimung und das Pflanzenwachstum praktisch vollkommen verhindern.

3. Im humusarmen Sandboden werden bessere Resultate erreicht, aber bei einem Konzentrationsgrad von 1,5 Proz. hört auch hier das Pflanzenwachstum vollkommen auf.

4. Die untersuchten Holzpflanzen sind weit höher empfindlich, wie die Getreidepflanzen. Im destillierten Wasser bei 0,3 und 0,4 Proz. wird die Keimung ganz verhindert und das Resultat auch im

Sandboden nicht merklich besser, so daß bei den obigen Konzentrationsgraden bei Alkaliböden die Aufforstung auf große Schwierigkeiten stoßen wird.

5. Bei geringerer Konzentration verspricht jedoch die Aufforstung infolge der Humusbereicherung gute Ergebnisse, weil der Humusgehalt die Giftwirkung des Na_2CO_3 bzw. der OH-Ionen stark herabsetzen kann.

6. Die Absorption von Na_2CO_3 ist sehr gering, sie betrug pro Versuchspflanze bei einer 0,4proz. Konzentration und 14 Tagen Versuchsdauer kaum 0,00506 g.

Die weiteren Versuche, deren Aufgabe auf Grund der bereits vorliegenden Untersuchungen die teilweise Klärung der theoretischen Grundlagen dieser Frage ist, sind im Gange.

Literatur.

Infolge des großen Umfanges erwähnen wir nur die folgenden: 1) Dr. *E. Sigmond*, Unsere Szikböden und die Methoden der Aufbesserung (ungarisch), S. 296. Budapest 1923. Enthält die vollständige Literatur. — 2) *Treitz* und *Zsilinszky*, Die Verbesserung der Szikböden. Budapest 1923. — 3) *Glinka*, Die Typen der Bodenbildung. — 4) *Ehrenberg*, Die Bodenkolloide. — 5) *Russel-Brehm*, Boden und Pflanze. — 6) *Vági*, Über die Szikböden. Ung. forstl. Blätter **61**, 1922. — 7) *A. Brown*, Proc. Roy. Soc. **181**, 1909. — 8) *Derselbe*, ebendaselbst **126**, 1905. — 9) *Sigmond*, Landw. Versuchsst. **47**, 1896. — 10) *Harris*, Journ. agricult. Research **24**, 317, 1923. — 11) Diese Zeitschr. **158**, H. 1/2.

Einfluß des Insulins auf den Wasser-Salz-Haushalt des nichtdiabetischen Organismus.

Von

H. Vollmer und J. Serebrijski.

(Aus dem Kaiserin-Auguste-Victoria-Haus.)

(Eingegangen am 23. März 1925.)

Das Indikationsgebiet des Insulins wächst mit der zunehmenden Kenntnis seiner verschieden gerichteten Wirkung und es ist schon jetzt abzusehen, daß es nicht auf die Behandlung des Diabetes mellitus beschränkt bleiben wird. Seine stoffwechselbeschleunigende Wirkung, die der eine von uns (1) am Maß der Säureausscheidung mit dem Harn feststellen konnte, macht es vielleicht zur Bekämpfung auch nichtdiabetischer acidotischer Zustände geeignet. Die alkalotische Insulinwirkung hat sich inzwischen unter anderem auch an einer Beobachtung *Behrendts* und *Hopmanns* (2) bestätigt; sie sahen bei übererregbaren Individuen die galvanische Erregbarkeit der Skelettmuskulatur nach Insulin noch mehr als nach anderen stoffwechselbeschleunigenden Hormonen ansteigen. Obwohl auf Grund des bekannten Stoffwechselantagonismus zwischen Tetanie und Rachitis jeder tetanigene Eingriff cum grano salis als antirachitisch wirksam angesehen werden darf, kommt dem Insulin diese Wirkung — jedenfalls in einem therapeutisch verwertbaren Maße — nicht zu. Das war schon aus theoretischen Gründen vorauszusehen, da Insulin dem Serum anorganische Phosphate entzieht, die zum Aufbau von Komplexverbindungen (Hexosephosphate) herangezogen werden. Und auch in einigen therapeutischen Versuchen ließ sich keine antirachitische Wirkung erkennen; der Serumphosphatgehalt blieb unverändert.

Ein weiteres Gebiet der Anwendung verspricht die Insulinwirkung auf den Wasserhaushalt. Zahlreiche Autoren berichten übereinstimmend, daß der diabetische Organismus durch Insulin das verlorene Wasserbindungsvermögen wiedergewinnt und unter Wasserretention starke Körpergewichtszunahmen erfährt. Mit Recht weisen *Priesel* und *Wagner* (2) darauf hin, daß diese wasserretinierende Fähigkeit zusammen mit der hypoglykämischen und antiglykosurischen und — die wir hinzufügen wollen — der antiazidotischen Wirkung das Insulin

zur Behandlung der alimentären Intoxikation der Säuglinge geeignet erscheinen lassen könnte. Wir haben solche klinische Versuche schon vor längerer Zeit angestellt, aber keine überzeugenden Erfolge gesehen. Schwere Intoxikationen waren durch Insulin nicht zu retten, und die Erfolge bei leichteren Fällen erlauben bei gleichzeitiger diätetischer Therapie kein Urteil. Gleichwohl ist die Insulintherapie derartiger, mit Wasserverarmung einhergehender Ernährungsstörungen theoretisch hinreichend begründet. Für eine exakte Indikation ist jedoch genaue Kenntnis der Insulinwirkung auf den Wasserhaushalt Voraussetzung. Hierüber fehlen jedoch unseres Wissens planmäßige Arbeiten.

Unsere Untersuchungen gingen von einer Feststellung *Meyer-Bischs* (3) an Diabetikern aus. Er fand regelmäßig eine Hypochlorämie bei gleichzeitiger Bluteindickung und eine Hypochlorurie nicht nur bei schweren, sondern auch bei mittelschweren und leichten Diabetikern. Diese Veränderungen sind wohl in erster Linie Folgeerscheinungen des gestörten Kohlehydratstoffwechsels. Es ist aber nicht von der Hand zu weisen, daß sie mit der gestörten Funktion des Inselapparats in direkter Beziehung stehen. Wissen wir doch, daß auch andere endokrine Organe den Wasser- und Salzhaushalt weitgehend beherrschen. Es war also die Frage, ob das Insulin auch in dieser Richtung wie bei der diabetischen Störung des Kohlehydratstoffwechsels regulierend und restituierend wirkt, insbesondere aber, *ob ihm die Fähigkeit zukommt, ein gestörtes Wasserbindungsvermögen auch im nichtdiabetischen Organismus wieder herzustellen.* Ist dies der Fall, so hätte die klinische Medizin, besonders aber die Pädiatrie, ein wertvolles therapeutisches Hilfsmittel gewonnen.

Methode.

Dem Studium des Wasserwechsels stehen bekanntlich große methodische Schwierigkeiten entgegen. Da es nicht nur darauf ankommt, das Verhältnis von aufgenommenem und abgegebenem Wasser, sondern auch die intermediären Verschiebungen zwischen Blut und Geweben kennenzulernen, ist die Bestimmung der Blutkonzentration von großer Bedeutung. Hierfür besitzen wir aber keine einzige unbedingt zuverlässige Methode. Der Einfachheit halber beschränkt man sich häufig auf die *refraktometrische Bestimmung des Serumeiweißgehalts.* Änderungen dieser Werte können aber ebensogut durch Wasserverschiebungen innerhalb des Blutes selbst zwischen Blutkörperchen und Plasma zustande kommen, als durch Wasserverschiebungen zwischen Blut und Gewebe und Eiweißverschiebungen zwischen Blut und Gewebe [*Nonnenbruch* (4)]. Als weit zuverlässigerer Maßstab werden die *Erythrocytenzahlen* und die *Hämoglobinwerte* angesehen [*Magnus* (5), *Nonnenbruch* (6), *Hofmeier* (7) u. a.]. Ihre Brauchbarkeit hat zur Voraussetzung, daß sich der Gesamterythrocytenbestand in der Blutbahn während der Dauer eines Versuchs nicht ändert und daß die Erythrocyten in den verschiedenen Gefäßgebieten gleichmäßig verteilt sind. Diese Voraussetzungen sind gerade bei länger dauernden Versuchen nicht immer erfüllt, wenn auch *Nonnenbruch* (6) und seine Mitarbeiter im Menschen- und Tier-

versuch die Erythrocytenzahl in verschiedenen Gefäßgebieten übereinstimmend fanden. Veränderungen in der Funktion der hämatopoetischen Organe können gerade da, wo die Versuchsanordnung Eingriffe verschiedener Art und längerer Dauer erfordert, die Brauchbarkeit der Werte beeinträchtigen. Nach Beobachtungen *Glasers* (8) muß auch die Möglichkeit von Erythrocytenverschiebungen im strömenden Blut analog der verschiedenen Leucocytenverteilung in Betracht gezogen werden, gerade da, wo häufige Blutentnahmen, die an sich als Hautreize wirken können, notwendig sind. Schließlich muß bei kleinen Tieren wiederholter Blutentzug einem Aderlaß gleichgeachtet werden, der an sich die Blutkonzentration weitgehend beeinflussen kann. Dazu ist die Bestimmung der Erythrocytenzahl und des Hämoglobins auch bei Berücksichtigung aller Vorsichtsmaßregeln eine Methode, die nicht frei von Fehlerquellen ist. Es besteht also Grund genug, nur größeren Veränderungen Beachtung zu schenken. Die größte Sicherheit bietet die gemeinsame Bestimmung von Serumeiweißgehalt, Hämoglobin und Erythrocytenzahl sowie der Trockensubstanz des Blutes. Arbeitet man aber an kleinen Versuchstieren und will man zugleich andere Bestandteile, etwa den Blutkochsalzgehalt, in zahlreichen Blutproben kurz nacheinander untersuchen, so muß man auf eine derartige Vollständigkeit verzichten, um störende Blutverluste zu vermeiden. Da wir in der ersten Versuchsreihe an Kaninchen experimentierten und die Veränderung des Blutkochsalzspiegels nach Insulininjektionen verfolgen wollten, mußten wir uns mit der Bestimmung jeweils eines der Werte begnügen, die als Maßstab der Blutkonzentration in Betracht kommen. Gleichwohl erlaubt es die große Versuchszahl (35), zu einem Urteil über die wahren intermediären Wasser- und Kochsalzverschiebungen zu gelangen.

Die ersten Untersuchungen stellten wir an Kaninchen nach einer Nahrungspause von mindestens 5, höchstens 20 Stunden an. Vor der Insulininjektion wurden zwei bis vier Blutproben aus der Ohrvene entnommen, nach der Injektion mehrfach in verschiedenen Zeitabständen. Nennenswerte Blutverluste wurden hierbei peinlichst vermieden. NaCl bestimmten wir im Gesamtblut in zwei bis drei Kontrollen nach der Mikromethode *Bangs* und verwendeten bei der Titration als Indikator zum Teil Kaliumchromat, zum Teil nach Zusatz von Silbernitrat im Überschuß Eisenammoniakalaun (nach *Volhard*), dessen Farbumschlag deutlicher zu erkennen ist. Der Serumeiweißgehalt wurde refraktometrisch nach *Pulfrich-Weiss*, das Hämoglobin kolorimetrisch im Autenriethkolorimeter bestimmt, die Erythrocytenzahl durch Auszählung von je 40 Quadraten bei dreimaliger Füllung der Zählkammer. Im allgemeinen verwendeten wir Insulin-*Wellcome*, zum Teil auch Insulin-*Brand* und Iloglandol; die Wirkung war die gleiche. Durchschnittlich wurden 2,5 Einheiten Insulin subkutan oder intramuskulär zugeführt, eine Dosis, die nicht selten, und nach längerer Nahrungspause fast immer, einen hypoglykämischen Symptomenkomplex auslöste. Leichtere Erscheinungen ließen wir spontan abklingen, schwerere unterdrückten wir durch Adrenalin- und Traubenzuckerinjektion und verfolgten während der Erholung des Tieres vielfach die Veränderungen des Blutes weiter. Nie verloren wir ein Tier im Insulinschock. Dagegen sind uns viele an sich junge und kräftige Tiere mehrere Tage nach dem letzten Insulinversuch eingegangen, obwohl sie sich kurz nach dem Versuch wieder vollkommen erholt hatten. Sie zeigten verminderte Freßlust und allmählich zunehmende Körperschwäche. Wir schließen daraus, daß die Insulinvergiftung auch zu irreparablen Schädigungen führt.

Zu den mehrtägigen Versuchen am Menschen wurden Säuglinge in die Stoffwechselschwebe gebracht, der Harn in eisgekühlten Flaschen, der Stuhl davon getrennt in abgewogenen Stücken von Guttaperchapapier aufgefangen. Das Stuhlgewicht wurde nach jeder Entleerung festgestellt. Die Säuglinge erhielten schon 4 Tage vor Beginn der eigentlichen Vorperiode eine konstante Nahrung, und zwar einfache Milchmischungen, die entweder für je 3 bis 4 Tage oder für die Dauer des ganzen Versuchs gemeinsam in der Milchküche zubereitet und im Kühlraum aufbewahrt wurden. Der Cl-Gehalt der Milch wurde in großen Mengen und dreifachen Proben nach *Volhard* bestimmt, ebenso der Cl-Gehalt des Harnes und des Stuhles. Dieser wurde für jede Versuchsperiode getrennt gesammelt, auf dem Wasserbad getrocknet, pulverisiert und mit Salpetermischung verascht. Aus der Gewichtsdifferenz des frischen Stuhles und seines Trockenrückstandes wurde der Wassergehalt pro Periode errechnet. Der extrarenale Wasserverlust wurde aus dem Körpergewicht, dem Gewicht der aufgenommenen Flüssigkeit und der Harnmenge berechnet. Im Harn haben wir außerdem N, NH_3, p_H und die titrierbare Acidität nach *Kjeldahl, Folin* bzw. *Michaelis* bestimmt, und aus diesen Daten den Gesamtsäurekoeffizienten $\frac{A + NH_3}{N} \times 100$ nach *György* berechnet.

Alle Einzelheiten der Versuchsanordnung sind aus den Tabellen zu erkennen. Die Versuche wurden nur an vollkommen gesunden Erwachsenen und Kindern ausgeführt. Um Raum zu sparen, geben wir nur einen Teil unserer Protokolle wieder.

Versuchsergebnisse.

I. Teil.

Die subkutane oder intramuskuläre Injektion von 2 bis 3 Einheiten Insulin führt beim gesunden, nüchternen Kaninchen zu einer *Vermehrung des Kochsalzgehalts im Blute*, in einigen Fällen nach einer initialen Verminderung (Tabelle I bis III). Die Hyperchlorämie erreicht

Tabelle I.

Zeit	Na Cl g-Proz.	Serumeiweiß Proz.	Erythrozyten	Bemerkungen
4h20'	0,532	7,35	4,29	
4 22	0,530	—	—	
4 28	0,502	—	—	
4 31	—	—	—	← 2,5 E. Insulin
4 41	0,508	6,98	4,05	
4 43	0,517	—	—	
4 53	0,553	7,16	4,08	
4 56	0,547	—	—	
5 13	0,548	6,72	4,00	
5 16	0,542	—	—	
5 37	0,528	6,84	3,93	
5 40	0,545	—	—	
6 07	0,546	6,30	4,07	
6 39	0,561	6,07	3,87	
6 42	0,558	—	—	
7 16	0,550	7,01	4,24	

Tabelle II.

Zeit	NaCl g-Proz.	Hb Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Hb Proz.
3h00′	0,540	59,0		3h40′	0,538	—
3 02	0,520	—		3 45	0,554	59,0
3 05	0,552	—		4 00	0,585	53,4
3 08	—	—	← 3 E. Insulin	4 05	0,571	—
3 12	0,514	63,2		4 30	0,564	51,8
3 15	0,503	—		4 40	0,572	—
3 25	0,546	64,6		5 20	0,579	61,8

Tabelle III.

Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen
12h36′	0,534	S. E. 6,28 Proz.	2h15′	0,599	S. E. 5,83 Proz.
12 47	0,533		2 35	0,628	
12 51	—	← 2 E. Insulin	3 00	0,584	
1 11	0,576		3 23	0,613	
1 30	0,543	S. E. 6,29 Proz.	4 00	0,584	
1 50	0,571		4 32	0,604	

nur selten hohe Grade — die Vermehrung betrug durchschnittlich 10 Proz. —, aber die Regelmäßigkeit, mit der sie sich einstellt, macht sie zu einem sicheren Befund. Bei gleichzeitiger Bluteindickung könnte sie auf dem Abstrom einer kochsalzarmen Flüssigkeit aus dem Blute ins Gewebe zurückzuführen sein, da wir aber im Gegenteil eine *Blutverdünnung* nach Insulin beobachteten, müssen wir eine absolute Kochsalzanreicherung des Blutes annehmen. Die Abnahme der Blutkonzentration äußerte sich sowohl in den Serumeiweißwerten (S. E.) als in der Erythrozytenzahl (E. Z.) und dem Hämoglobingehalt (Hb.) des Blutes, weitaus am stärksten jedoch in den S. E.-Werten, die in der Regel um 10 bis 20 Proz. sanken. Wäre der Einstrom selbst einer eiweißfreien Flüssigkeit in die Blutbahn die Ursache der Blutverdünnung, so müßten S. E. und E. Z. im gleichen Verhältnis abnehmen. Das Zurückbleiben der E. Z.- und Hb.- hinter der S. E.-Abnahme kann als nur durch Eiweißabstrom in die Gewebe erklärt werden. Die häufig beobachtete Unabhängigkeit der S. E.- und E. Z.-Veränderungen voneinander stützt diese Annahme. Unter Insulinwirkung findet also, wenn gewisse Voraussetzungen (unveränderte Nierenfunktion usw.) zutreffen, ein Einstrom relativ eiweißarmer und kochsalzreicher Flüssigkeit aus den Geweben ins Blut statt, wahrscheinlich unter gleichzeitigem *Eiweißabstrom aus dem Blute ins Gewebe.* Dieser Vorgang hält mehrere Stunden an und ist beim Auftreten eines hypoglykämischen Symptomkomplexes in voller Höhe ausgebildet. Nach 4 Stunden zeigte der Blutkochsalzspiegel noch keine Tendenz, zur Norm zurückzukehren,

während sich die Blutkonzentration um diese Zeit in einigen Fällen wieder den ursprünglichen Verhältnissen näherte. Über diese Zeit hinaus haben wir unsere Untersuchungen nicht ausgedehnt, einmal aus Rücksicht auf die Versuchstiere, die wir vielfach durch Adrenalin und Traubenzuckerinjektion aus dem Insulinkomplex retten wollten, dann aus Rücksicht auf die Versuchsresultate, deren Brauchbarkeit unter allzu häufigen Blutentnahmen leiden mußte.

Hier liegt zugleich der Haupteinwand gegen unsere Resultate. *Sind die gefundene Kochsalzvermehrung und Blutverdünnung nicht einfach die Folge des Blutverlustes und als Aderlaßhyperchlorämie und -hydrämie aufzufassen?* Auch ohne unsere Paralleluntersuchungen an Erwachsenen heranzuziehen, können wir an Hand unserer Tierversuchsprotokolle diesen Einwand zurückweisen. Wir haben zunächst bei sonst gleicher Versuchsanordnung auf das Studium der Blutkonzentrationsverhältnisse verzichtet und in selteneren Proben unter möglichster Vermeidung eines Blutverlustes nur den Blutkochsalzwerten unsere Aufmerksamkeit geschenkt. Dabei fanden wir eher eine stärkere Hyperchlorämie als in den Versuchen, die größere Blutmengen erforderten (Tabellen IV bis VI). Noch deutlicher sprechen die später zu erwähnenden Versuche mit Adrenalin, die bei gleichen Blutverlusten regelmäßig zu einer Bluteindickung führten. Da nach Untersuchungen *Böhms* (9) der Aderlaß auch unter Adrenalinwirkung zu einer Blut-

Tabelle IV.

Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen
12h17'	0,510		2h00'	0,591	
12 25	0,503		2 20	0,565	
12 29	0,516		2 40	0,585	
12 38	—	← 2,5 E. Insulin	3 00	0,574	
12 40	0,538		3 22	0,563	
12 58	0,565		3 42	0,587	
1 00	0,564		4 02	0,583	
1 20	0,608				

Tabelle V.

Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen
12h39'	0,565		1h55'	0,585	
12 41	0,568		2 16	0,600	
12 49	0,570		2 40	0,623	
12 51	—	← 3 E. Insulin	3 00	0,648	
1 12	0,663		3 20	—	Stürmischer Insulinkomplex, Zuckerinjektion
1 35	0,570				

Tabelle VI.

Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen
11h52'	0,509		12h36'	0,496	
11 58	0,516		12 55	0,531	
12 02	0,504		1 16	0,576	Muskelschlaffheit
12 06	—	← 2,5 E. Insulin	1 37	0,551	
12 17	0,515		2 14	0,590	Zunehmende Muskelschlaffheit
12 22	0,558		2 35	0,619	
12 29	—	← 1,0 E. Insulin			

verdünnung führt, läßt sich ausschließen, daß die häufigen Blutentnahmen in unseren Versuchen nach Art eines Aderlasses wirken.

In welcher Beziehung stehen nun unsere Befunde zu der bekannten Insulinwirkung auf den Kohlehydratstoffwechsel? Sind sie unabhängig voneinander nur koordiniert oder besteht zwischen ihnen ein innerer Zusammenhang? Diese Frage können wir zunächst nicht beantworten, nur eine Möglichkeit wollen wir diskutieren. Die einfachste Deutung wäre, die Hyperchlorämie als Folge der Hypoglykämie und als osmoregulatorischen Vorgang aufzufassen. Der Organismus sucht während der Blutzuckersenkung den osmotischen Druck des Blutes aufrecht zu erhalten, indem er Kochsalz den Gewebsdepots entnimmt, ein Vorgang, der nur unter gleichzeitigem Flüssigkeitsstrom in die Blutbahn erfolgen kann. In analoger Weise erklärt *Herrick* (10) die Hypochlorämie im Gefolge der Hyperglykämie nach peroraler Glykosezufuhr.

Wir haben auf experimentellem Wege versucht, die Unhaltbarkeit dieser Deutung darzutun. Anfangs erwarteten wir von jenen Versuchen Aufschluß, in denen wir zur Bekämpfung der Insulinintoxikation Adrenalin und Traubenzuckerlösung injizierten und so die Hypoglykämie aufhoben. Dabei sahen wir allerdings zugleich mit dem Verschwinden des hypoglykämischen Symptomenkomplexes mehrmals die vorher erhöhten Blutkochsalzwerte zur oder unter die Norm absinken (Tabelle VII), eine Beobachtung, die im Sinne der obigen Deutung spräche. Wir kamen aber zu der Überzeugung, daß wir hieraus keine

Tabelle VII.

Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen
11h30'	0,632		1h10'	0,579	
11 34	0,628		1 33	0,647	Krämpfe. Traubenzuckerinjektion
11 39	0,622		3 19	0,568	Tier erholt
11 41	—	← 3,0 E. Insulin	3 21	0,584	
12 08	0,639		3 25	0,531	
12 30	0,710				
12 50	0,661				

Schlüsse ziehen dürfen, da bei diesem Vorgehen mit der Veränderung der Blutkonzentration so verschiedenartige Eingriffe in den Wasserhaushalt verknüpft sind und dies in einem Versuchsstadium, in dem sich das Tier in einem schweren pathologischen Zustand befindet. Um die Verhältnisse klarer überblicken zu können, untersuchten wir die verschiedenen Hyperglykämie erzeugenden Eingriffe einzeln, nämlich die Wirkung des Adrenalins einerseits und der Traubenzuckerinjektion andererseits auf den NaCl-Gehalt und die Konzentration des Blutes. Damit begaben wir uns auf ein zum Teil schon erforschtes Gebiet; aber es kam uns darauf an, die Vorgänge am gleichen Versuchstier zu studieren.

Wäre unsere hypothetische Deutung hinreichend, so müßte Adrenalin seiner hyperglykämischen Wirkung entsprechend eine Hypochlorämie auslösen. In unseren Versuchen blieb aber *nach Injektion von 0,0003 g Suprarenin* (0,3 ccm 1:1000) der *Blutkochsalzspiegel* im wesentlichen *unverändert* (Tabellen VIII bis XI). In einigen Versuchen

Tabelle VIII.

Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen
3h34'	0,514		4h10'	0,522	
3 37	0,502		4 22	0,511	
3 40	0,523		4 34	0,515	
3 45	—	← 0,0003 g Suprarenin	4 44	0,533	
3 58	0,498		4 55	0,504	

Tabelle IX.

Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen
1h42'	0,534	S. E. 6,45 Proz.	2h40'	0,533	S. E. 6,45 Proz.
1 52	0,526		2 54	0,568	
1 53	0,546		3 10	0,528	S. E. 6,77 Proz.
1 55	—	← 0,0003 g Suprarenin	3 21	0,529	
2 05	0,549		3 28	0,555	
2 20	0,573				

Tabelle X.

Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen
1h22'	0,563	S. E. 6,58 Proz.	2h07'	0,575	
1 26	0,563		2 22	0,555	
1 30	0,577		2 42	0,533	
1 35	—	← 0,0003 g Seprarenin	2 57	0,546	S. E. 7,24 Proz.
1 45	0,558		3 16	0,563	
1 56	0,598	S. E. 6,77 Proz.			

Tabelle XI.

Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen
12h15'	0,588		1h02'	0,595	
12 25	0,588	S. E. 6,02 Proz.	1 13	0,584	
12 27	0,563		1 23	—	S. E. 6,47 Proz.
12 31	—	← 0,0002 g Suprarenin	1 33	0,595	
12 42	0,552		1 46	0,564	
12 52	0,572	S. E. 6,28 Proz.			

sahen wir geringe Schwankungen der Werte nach beiden Richtungen, Schwankungen, die kaum die Grenzen der methodischen Fehlerquellen überschritten. *Dabei nahm die Blutkonzentration, gemessen an den S. E.-Werten, regelmäßig zu,* ein Befund, der auch von zahlreichen anderen Autoren, zuerst von *O. Hess* (11) und *W. Erb jun.* (12) erhoben wurde. Von einer zweiphasigen Adrenalinwirkung sahen wir keine Andeutung, zumal wir im wesentlichen nur die erste hyperglykämische Periode beobachteten. Der geringe Grad der Bluteindickung gibt uns kaum ein Recht, trotz der Konstanz der NaCl-Werte von einer relativen Hypochlorämie zu sprechen. Und damit würden wir auch nichts gewinnen. Denn gerade bei einer Blutkonzentrierung müßte beim Vorwalten osmoregulatorischer Vorgänge eine Hyperglykämie eine um so stärkere Kochsalzverdrängung aus dem Blute hervorrufen. Im übrigen verfügen wir auch über Beobachtungen bei gleichbleibender oder in entgegengesetzter Richtung veränderter Blutkonzentration. Wir injizierten in einer Reihe von Fällen 0.0003 Suprarenin etwa 2 Stunden nach erfolgter Insulininjektion und verfolgten weiterhin die Veränderung der Blutzusammensetzung. *Die Insulinhyperchlorämie hielt sich nach Suprarenin auf gleicher Höhe oder stieg sogar noch weiter an, während die unter Insulin verminderte Blutkonzentration sich nach Supraremininjektion mit einer Ausnahme wieder der Norm zuwendet* (Tabellen XII bis XIV). Auch hier finden wir also *keinen Antagonismus zwischen Blutzucker- und NaCl-Spiegel.* Der Kochsalzspiegel ändert sich nicht, auch wenn man der Hypoglykämie durch Suprarenin entgegenwirkt.

Tabelle XII.

Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen
1h30'	0,538	S. E. 6,46 Proz.	3h25'	0,658	
1 33	0,561		3 33	—	← 0,0003 g Suprarenin
1 39	—	← 2,5 E. Insulin	3 55	0,663	
2 07	0,772		4 20	—	S. E. 6,57 Proz.
2 32	0,721	S. E. 6,12 Proz.	5 00	0,658	
2 56	0,722				

Tabelle XIII.

Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen
1h44′	0,566	S. E. 7,25 Proz.	3h30′	0,695	
1 47	0,557		3 34	—	← 0,0003 g Suprarenin
1 52	—	← 2,5 E. Insulin	4 05	0,650	
2 10	0,605		4 38	0,619	
2 37	0,623	S. E. 6,20 Proz.	4 47	—	S. E. 6,62 Proz.
2 59	0,576				

Tabelle XIV.

Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen
2h13′	0,673		4h25′	0,706	S. E. 6,08 Proz.
2 16	0,680		4 43	0,712	
2 20	0,656	S. E. 6,46 Proz.	4 44	—	0,0003 g Suprarenin
2 26	—	2,5 E. Insulin	5 07	0,839	
2 50	0,614		5 29	0,728	
3 12	0,658		5 49	0,705	S. E. 5,96 Proz.
3 33	0,712		6 19	0,858	
3 57	0,654		6 41	0,904	

Nicht nur für unsere speziellen Fragen sind diese Befunde von Interesse, sondern auch für das weitere Problem des *hormonalen Antagonismus zwischen Nebennieren und Inselapparat*, der hinsichtlich des Zuckerstoffwechsels so ausgesprochen ist. *Hier vermissen wir ein analoges Verhalten beider Hormone.* Und dies wird noch deutlicher in den folgenden Versuchen, bei denen wir *Insulin und Adrenalin gleichzeitig injizierten* (Tabelle XV, XVI). Während bei diesem Vorgehen die Hypoglykämie verhindert wird, *verhalten sich der Blutkochsalzspiegel und sogar die Blutkonzentration so, als ob nur Insulin gegeben worden wäre*, d. h. es kommt zu einer Hyperchlorämie und einer Hydrämie, die sich sowohl im S. E. wie in der E. Z. äußert. Wir er-

Tabelle XV.

Zeit	NaCl g-Proz.	Serumeiweiß Proz.	Erythrozyten	Bemerkungen
10h17′	0,539	7,78	7,36	
10 23	0,536	—	—	
10 26	0,532	—	—	
10 30	—	—	—	← 2,5 E. Insulin + 0,0003 g Suprarenin
10 50	0,515	—	—	
11 15	0,511	7,70	6,25	
11 40	0,561	7,35	6,42	
12 30	0,550	7,38	6,64	
12 52	0,553	—	—	
1 12	0,569	6,34	6,00	

Tabelle XVI.

Zeit	NaCl g-Proz.	Serumeiweiß Proz.	Erythrozyten	Bemerkungen
1h42'	0,542	6,44	3,80	
1 46	0,536	—	—	
1 50	0,527	—	—	
1 54	0,547	—	—	
2 02	—	—	—	← 2,5 E. Insulin + 0,0003 g Suprarenin
2 24	0,522	—	—	
2 27	0,535	—	—	
2 50	0,584	5,92	3,33	
2 55	0,567	—	—	
3 20	0,575	6,08	3,84	
3 24	0,588	—	—	
3 47	0,580	6,24	3,64	
4 13	0,575	6,06	3,72	
4 16	0,566	—	—	
4 55	0,584	5,68	3,28	
5 00	0,574	—	—	

kennen wiederum die Unabhängigkeit der Insulinhyperchlorämie von dem Blutzuckerspiegel.

Wir erzeugten schließlich, ähnlich wie *Herrick* (10), eine *Hyperglykämie durch intravenöse Traubenzuckerinjektion.* Wir gaben 1 g in 10proz. Lösung, eine relativ enorme Menge, die bei einem Kaninchen von 2000 g den Blutzuckergehalt kurz nach der Injektion rechnerisch etwa versechsfachen mußte. Dabei sahen wir wenige Minuten nach der Traubenzuckerinjektion eine kurzdauernde und zum Teil recht erhebliche *Hypochlorämie*, die aber in ihrer Prozentualität nicht einmal der enormen *Hydrämie* entsprach (Tabellen XVII, XVIII). Der Traubenzucker bedingt also eine starke Wasseranziehung aus dem Gewebe, ohne im geringsten Kochsalz aus der Blutbahn zu verdrängen. Im

Tabelle XVII.

Zeit	NaCl g-Proz.	Serumeiweiß Proz.	Erythrozyten	Bemerkungen
4h18'	0,524	7,67	5,29	
4 21	0,552	—	—	
4 24	0,529	—	—	
4 28	0,529	—	—	
4 34	—	—	—	← 10 ccm 10proz. Traubenzuckerlösung intravenös
4 39	0,488	6,82	4,33	
4 41	0,542	—	—	
4 46	0,533	6,98	4,71	
4 48	0,546	—	—	
5 00	0,562	7,40	4,34	
5 01	0,577	—	—	
5 08	0,573	—	—	
5 10	0,556	—	—	
5 22	0,503	6,45	4,03	

Tabelle XVIII.

Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen	Zeit	NaCl g-Proz.	Bemerkungen
1h35′	0,698		2h23′	0,680	
1 42	0,731		2 36	0,732	
1 47	—	5 ccm 20proz. Traubenzuckerlösung intravenös	2 55	0,738	
1 58	0,591		3 19	0,681	
2 09	0,576				

Gegenteil, das ins Blut einströmende Wasser zieht Kochsalz aus den Geweben nach sich, so daß schon kurze Zeit nach der Traubenzuckerinjektion der Blutkochsalzspiegel seine ursprüngliche Höhe oder noch höhere Werte erreicht. *Wir können es also endgültig ablehnen, daß osmoregulatorische Kräfte im Blute selbst eine irgendwie entscheidende Rolle für die von uns beobachteten Blutveränderungen spielen.*

Weit wahrscheinlicher ist es, daß die *Wasser- und Kochsalzverschiebungen in enger Beziehung zu dem intermediären Kohlehydratstoffwechsel* stehen. Aber wie dieser im nichtdiabetischen Organismus durch Insulin beeinflußt wird, darüber gehen die Meinungen, besonders was den intermediären Umsatz betrifft, noch weit auseinander. Wir können hier nicht auf die gesamte Insulinliteratur eingehen. Wir wollen nur die beiden diametralen Anschauungen hervorheben: 1. Insulin führt zu einer Glykogenverarmung [*Dudley* und *Marrian* (13)] und 2. unter Insulinwirkung steigt der Glykogenansatz in der Leber und Muskulatur. Diese letzte Ansicht hat neuerdings durch *Brugsch* und seine Mitarbeiter (14) eine starke Stütze gewonnen. Die widersprechenden Befunde haben nach den neueren Forschungsergebnissen ihren Grund offenbar darin, daß sich unter Insulinwirkung beide Prozesse gleichzeitig vollziehen. Insulin bewirkt eine Oxybiose, die der oxydativen Synthese dient, indem zunächst Zucker über die Milchsäure anoxybiotisch abgebaut und die Milchsäure oxybiotisch über die Hexosephosphorsäure rückläufig wieder zu Glykogen aufgebaut wird. Das Hungertier muß aber unter Insulin das Glykogen der Leber und Muskulatur durch die Zuckeroxydation einschmelzen und an Glykogen verarmen, da der Zuckermangel die Glykogenresynthese nicht zuläßt. Je nach dem Zustand des Normaltieres, speziell je nach dem Glykogenreichtum seiner Organe, muß also das Insulin die Glykogendepots erschöpfen (wie beim hungernden Tiere) oder zu einem Glykogenansatz führen.

Wir haben den Glykogengehalt in den Organen unserer Versuchstiere nicht bestimmt und können darum nur Vermutungen über ihn äußern. Dieser Lücke in der Analyse unserer Beobachtungen sind wir uns wohl bewußt, glauben sie aber theoretisch überbrücken zu können. Da wir unsere Versuchstiere vor der Insulinapplikation verschieden

lange hungern ließen, glauben wir, daß wir in den einen Fällen Glykogenverarmung, in den anderen Glykogenanhäufung in Leber und Muskulatur hervorgerufen haben. Bei Tieren, die 20 Stunden hungerten, dürfen wir annehmen, daß die Organe im hypoglykämischen Komplex hochgradig an Glykogen verarmt sind. Nach einer nur 5stündigen Nahrungspause dürften die gleichen Insulindosen, die zu keinen Vergiftungserscheinungen führten, den oxydativ-synthetischen Prozeß unter Aufbau von Glykogen befördert haben. Trotzdem fanden wir *in allen Fällen übereinstimmend eine Hyperchlorämie und Hydrämie. Und wir können diesen einheitlichen Befund sowohl aus einer Glykogenverarmung als auch aus einer Glykogenanreicherung der Gewebe herleiten.* Glykogenverarmung muß wie beim Diabetiker das Wasserbindungsvermögen der Gewebe herabsetzen. Dadurch wird Gewebswasser mobilisiert und in die Blutbahn eingeschwemmt, ein Vorgang, der in der Regel durch den Kochsalzeinstrom aus den Geweben begleitet ist. In den anderen Fällen muß der vermutete Glykogenansatz in der Leber und in der Muskulatur zu einer Erhöhung des Wasserbindungsvermögens und damit zu einer extrarenalen Wasserretention führen. Der Wassergehalt der Gewebe befindet sich beim nichtdiabetischen Versuchstier schon vor der Insulininjektion im Zustand des physiologischen Optimums. *Mit der Glykogenanreicherung durch Insulin gewinnen die Leber und die Muskulatur die Fähigkeit, Wasser an sich zu ziehen, die sich aber im Gegensatz zu den Verhältnissen beim wasserverarmten Diabetiker rasch erschöpft. Sobald aber der Gehalt an gebundenem Wasser in diesen Organen einen gewissen Sättigungsgrad erreicht hat, findet unter gleichzeitigem Anstieg des Blutkochsalzspiegels auch eine Wasseranreicherung im Blute statt.* So erklärt auch *O. Klein* (15) gelegentlich seiner Studien über den Wasserwechsel beim Diabetes mellitus seine Befunde. Während er bei schweren Diabetikern nach Beginn der Insulinbehandlung das Blut regelmäßig an Wasser und Kochsalz verarmen sah (Einwanderung in die Gewebe, die durch Insulin ihr Wasserbindungsvermögen wiedergewinnen), führten seine wenigen Vergleichsversuche am normalen Menschen zum gleichen Ergebnis wie unsere Tierexperimente, nämlich zu einer Hyperchlorämie und Hydrämie unmittelbar nach der ersten Insulininjektion. Auch wir können diese Befunde in Paralleluntersuchungen an normalen Erwachsenen bestätigen. Bei Verwendung kleiner Insulindosen (etwa $^1/_{10}$ der Menge, die den bei den Kaninchenversuchen verwendeten Dosen entsprächen) sahen wir gelegentlich die Blutkonzentration zunächst gleichbleiben oder sich sogar etwas erhöhen, manchmal mit einer initialen Senkung des Kochsalzspiegels verbunden (Tabelle XIX), und erst dann, wenn die Gewebe mit Wasser gesättigt sind, eine Tendenz zur Blutverdünnung und Hyperchlorämie eintreten (Tabellen XX, XXI).

Tabelle XIX.

Zeit	NaCl g-Proz.	Hb Proz.	Serumeiweiß Proz	Bemerkungen
1h 15'	0,497	98	9,78	
1 20	0,482	102	—	
1 37	—	—	—	10 E. Insulin Brand
1 57	0,448	98	9,49	
2 07	0,465	—	—	
2 40	0,464	103	9,92	
3 11	0,504	101	9,69	
3 16	0,518	—	—	
3 45	0,496	99	9,35	
3 48	0,489	—	—	
4 08	0,523	92	9,10	
4 12	0,501	—	—	

Tabelle XX.

Zeit	NaCl g-Proz.	Hb Proz.	Serumeiweiß Proz.	Bemerkungen
10h 19'	0,493	94	9,74	
10 21	0,495	—	—	
10 31	—	—	—	← 8 E. Insulin Brand
11 07	0,493	94	8,85	
11 10	0,494	—	—	
11 45	0,507	95	9,48	
11 47	0,507	—	—	
12 17	0,507	92	8,92	
12 20	0,512	—	—	
12 58	0,504	91	9,35	
1 00	0,534	—	—	
1 35	0,508	85	8,73	
1 37	0,528	—	—	

Tabelle XXI.

Zeit	NaCl g-Proz.	Hb Proz.	Serumeiweiß Proz.	Bemerkungen
1h 37'	0,480	101	8,64	
1 45	0,462	—	—	
1 50	0,472	108	—	
2 00	—	—	—	8 E. Insulin Brand
2 21	0,485	110	8,41	
2 25	0,459	—	—	
2 51	0,480	109	8,41	
2 54	0,468	—	—	
3 31	0,460	108	8,24	
3 36	0,467	—	—	
3 56	0,486	102	8,28	
3 58	0,527	—	—	
4 29	0,532	95	8,09	
4 35	0,540	—	—	

Die S. E.-Werte zeigten dabei autonome Schwankungen, mit einer Tendenz zur Verminderung. Bei einigen Versuchspersonen blieb das Blut nach so geringen Insulindosen in den untersuchten Bestandteilen unverändert; nur die S. E.-Verminderung fehlte nie. Wir nehmen an, daß dieser regelmäßigen *Hypoproteinämie* analog der Hyperproteinämie des Diabetikers eine eigene Bedeutung in der Stoffwechselwirkung des Insulins zukommt, in deren Wesen wir noch keinen Einblick haben.

Mit *O. Klein* halten wir es für möglich, daß das Insulin den Wasserwechsel nicht nur auf dem Wege über die Beeinflussung des Kohlehydratstoffwechsels verändert. Wir müssen daran denken, daß die *Leber*, der Hauptangriffspunkt der Insulinwirkung, auch auf Grund anderer Mechanismen als Regulationsorgan des Wasserhaushalts eine bedeutsame Rolle spielt [*Pick*, *Mautner* (16), (17) u. a.]. Es ist nicht unwahrscheinlich, daß das Insulin den *Sperrmechanismus der Lebervenen* in bestimmter Richtung beeinflußt und auch auf diesem Wege in den Wasserwechsel eingreift. Außerdem ist es nicht von der Hand zu weisen, daß Insulin ähnlich wie andere Hormone eine direkte *Wirkung auf den Quellungszustand der Blutkolloide* ausübt und ebenso den Hydrakationsgrad der Zellkolloide nicht nur auf dem Umwege über den Zuckerstoffwechsel verändert. Aciditätsveränderungen mögen dabei eine Rolle spielen. Auch die unter Insulin sich vollziehenden chemischen Umsetzungen können nicht ganz bedeutungslos sein, indem bei ihnen sowohl Wasser gebunden als in Freiheit gesetzt wird. Das Resultat all dieser Prozesse, die vielleicht einander entgegenlaufen, mögen unsere Befunde sein.

Wir dürfen uns nicht soweit in das Hypothetische verlieren. Unser Ziel war, zu untersuchen, ob auch beim nichtdiabetischen Organismus durch Insulin eine Erhöhung des Wasserbindungsvermögens und eine Wassereinsparung zu erreichen ist. Unsere Tierversuche deckten nur einige intermediäre Vorgänge, speziell die Blutveränderungen auf, ohne unsere Frage zu beantworten, da wir die renale und extrarenale Wasserausscheidung bisher unberücksichtigt ließen. In der folgenden Untersuchungsreihe wenden wir uns diesen Verhältnissen zu.

II. Teil.

Die Versuche wurden an gesunden Menschen angestellt, teils an älteren Kindern, teils in Selbstversuchen. Wir hatten Bedenken, einfach an verschiedenen Tagen die Diurese und den Austausch zwischen Blut und Geweben ohne und mit Insulin zu vergleichen, da man nicht annehmen kann, daß diese Vorgänge an sich beim gleichen Individuum im Nüchternzustand an verschiedenen Tagen völlig übereinstimmend ablaufen. Wir machten uns die Erfahrung über die Wirkung des Hypophysenextrakts zunutze. Beim normalen Menschen löst dieses

Hormon ganz unregelmäßige und unsichere Wirkungen aus. Die Diuresehemmung und der Einfluß auf den Austausch zwischen Blut und Geweben tritt erst dann deutlich beim Normalen hervor, wenn er mit Wasser belastet wird [zitiert nach *Veil* (18)]. Auch wir glaubten deutlichere Resultate zu erhalten, wenn wir die Insulinwirkung im *Volhard*schen Wasserversuch studierten. Es ist bekannt, daß abundante perorale Wasserzufuhr diuretisch und demineralisierend wirkt. Dabei kommt es gewöhnlich nicht oder nur zu einer geringen Hydrämie. Bei normalem Zustand der Gewebe verschwinden alle dem Blutstrom zugeführten fremdartigen Stoffe sofort aus ihm und werden von den Geweben wie von einem großen Schwamm aufgesaugt. Das im Gewebe angehäufte Wasser wird allmählich und überschüssig wieder ausgeschieden, und zwar sowohl auf renalem als auch auf extrarenalem Wege. Für den Ausfall des Versuchs ist also in erster Linie das Gewebe und sein Wasserbindungsvermögen entscheidend. Veränderungen in der Wasserausscheidung und im intermediären Flüssigkeitsaustausch, die sich unter Insulinwirkung ergeben, müssen darum in erster Linie auf eine Umstimmung der Gewebe hindeuten.

Wir haben Kinder 800 ccm Wasser innerhalb 30 Minuten, Erwachsene 1500 ccm innerhalb 10 Minuten morgens nüchtern trinken lassen und den Wasser- und Kochsalzwechsel 4 Stunden lang verfolgt, zuerst ohne, dann mit Insulin. Um einen Einfluß des ersten auf den Ablauf des zweiten Trinkversuchs mit Insulin auszuschließen, schalteten wir zwischen beide unter möglichster Konstanz der Ernährung eine ein- bis mehrtägige Pause ein. Wir lassen nun die Protokolle unserer Versuche folgen, aus denen die Einzelheiten der Versuchsanordnung zu erkennen sind.

Versuch J. S. (Tabelle XXII).

Im Vorversuch ohne Insulin ist das zugeführte Wasser nach 4 Stunden zu etwa 100 Proz. wieder ausgeschieden. Das Blut wird initial etwas verdünnt, wenn man die vorübergehende Abnahme der S. E.-Werte nicht eher auf einen Eiweißabstrom in die Gewebe zurückführen will. Späterhin steigt der Eiweißgehalt des Blutes vorübergehend stark an. Der Blutkochsalzspiegel erfährt keine einsinnige Veränderung und schwankt um den Ausgangswert.

Ganz anders gestalten sich die Verhältnisse, wenn man kurz vor der Wasserzufuhr 15 Einheiten Insulin intramuskulär injiziert. Nun kommen in der gleichen Zeit nur 74 Proz. des zugeführten Wassers wieder zum Vorschein. Es werden also etwa 26 Proz. retiniert. Die *renale Ausscheidung* ist stark *eingeschränkt* und sistiert bereits $2\frac{1}{2}$ Stunden nach der Wasseraufnahme; in den folgenden 2 Stunden kann die Versuchsperson keinen Harn lassen. Dabei ist die *Kochsalzausscheidung mit dem Harn fast auf die Hälfte reduziert.* Die gleichzeitige Hypochlorämie zeigt an, daß mit dem Wasser auch Kochsalz im Gewebe retiniert wurde. Die *extrarenale Ausscheidung* ist am zweiten Versuchstag *höher* als am ersten, wohl infolge der

Tabelle XXII.

J. S. 26 Jahre. — Insulinwirkung beim Normalen. Trinkversuch ohne und mit Insulin.

Zeit	Körpergewicht	Harn							Extrarenale Ausscheidung	Blut		Bemerkungen
		Menge	Spezifisches Gewicht	NaCl		p_H	Acidität			Serumeiweiß	NaCl	
				Proz.	g		Proz.	total		Proz.	g-Proz.	
1. Versuchstag												
10h 0′	70 720	—	—	—	—	—	—	—	—	9,88	0,462	10h bis 10h 10′ 1500 ccm Wasser nüchtern
10 10	72 210	—	—	—	—	—	—	—	(10)	—	—	
11 0	72 000	169	1006	0,206	0,348	6,3	3,6	6,1	41	9,17	0,488	
11 30	71 580	367	1003	0,060	0,220	6,65	0,4	1,5	53	9,87	0,440	
12 30	71 050	468	1001,5	0,245	1,147	6,65	0,7	3,3	62	10,91	0,492	
1 30	70 710	306	1002,5	0,194	0,594	6,43	1,4	4,3	34	9,39	0,441	
2 30	70 700	—	—	—	—	—	—	—	10	—	—	Kein Harn
Summe in g . .	1 510	1310	—	—	2,309	—	—	15,2	200	—	—	
Summe in Proz.	$100^2/_3$	$87^1/_3$	—	—	—	—	—	—	$13^1/_3$	—	—	
2. Versuchstag												
10h 0′	70 630	—	—	—	—	—	—	—	—	9,25	0,467	10h 15 E. Insulin intramuskulär
10 18	72 100	—	—	—	—	—	—	—	(30)	—	—	10h bis 10h 18′ 1500 ccm Wasser nüchtern
11 0	71 970	95	1010	0,288	0,274	6,2	4,76	4,28	35	9,21	0,445	
11 30	71 380	490	1003	0,063	0,309	6,6	0,4	1,96	100	8,67	0,443	Starke Schweiße. Tremor. Kältegefühl
12 30	71 000	230	1005	0,287	0,660	6,85	0,44	1,01	150	9,23	0,418	
1 30	70 990	—	—	—	—	—	—	—	10	8,69	0,436	1h 30′ und 2h 30′ kein Harn
Summe in g . .	1 110	815	—	—	1,243	—	—	7,25	295	—	—	
Summe in Proz.	74	$54^1/_3$	—	—	—	—	—	—	$19^2/_3$	—	—	

starken Schweiße, die im Anschluß an die Insulininjektion auftraten. Die *Säureausscheidung mit dem Harn* wird *durch Insulin herabgesetzt.*

Versuch H. V. (Tabelle XXIII).

Hier liegen die Verhältnisse ähnlich wie im vorausgehenden Versuch. Nur sind sie weniger ausgesprochen. Offenbar waren bei dieser Versuchsperson schon vorher die Gewebe mehr mit Wasser und Kochsalz gesättigt, so daß nur eine geringere, aber immerhin sehr deutliche Retention unter Insulin möglich war. Die Sättigung der Gewebe äußert sich auch darin, daß der Kochsalzeinstrom in die Gewebe nicht bis zur Hypochlorämie führt und sich schließlich auch das Blut mit dem Wasser anreichert, das von den Geweben nicht mehr aufgenommen werden kann. Auch hier sehen wir die renale Wasserausscheidung anders ablaufen als ohne Insulin. Die Wirkung des Wasserstoßes ist etwa 11 Uhr 30 Minuten gewissermaßen schon beendet, um 12 Uhr kann kein Harn gelassen werden. Und um 12 Uhr 30 Minuten wird eine geringe Harnmenge entleert, die ein relativ hohes spezifisches Gewicht, hohen Kochsalzgehalt und eine hohe Acidität aufweist.

Versuch E. F. (Tabelle XXIV).

Auch dieser Versuch bietet nichts prinzipiell Neues. Wiederum sieht man die renale Ausscheidung in ihrem Ablauf durch Insulin verändert. Nicht nur daß 1 Stunde nach der Wasseraufnahme im Gegensatz zum ersten Versuchstag die Diurese noch nicht begonnen hat, ist sie bereits 2 Stunden nach Versuchsbeginn im wesentlichen beendet, nachdem in dieser zweiten Stunde allerdings eine enorme Harnflut eingetreten ist. Die renale Ausscheidung des aufgenommenen Wassers vollzieht sich also unter Insulin innerhalb 1 Stunde, während sie sich ohne Insulin auf 2½ Stunden ausdehnt. Der am zweiten Versuchstag um 12 Uhr 30 Minuten nach zweistündiger Pause ausgeschiedene Harn ist deutlich anderer Natur, als die vorausgehenden Portionen, er ist höher gestellt, kochsalzreicher und stark sauer. Wir halten uns für berechtigt, diese letzte Portion mit der Wasserstoßwirkung nicht mehr in direkten Zusammenhang zu bringen, und drücken dies durch die eingeklammerten Werte der Endberechnung aus, die eine deutliche Diuresehemmung erkennen läßt. Das Blut zeigt in diesem Falle keine wesentlichen Veränderungen, nur der Kochsalzspiegel sinkt am Ende des Insulinversuchs.

Versuch W. Ch. (Tabelle XXV).

Dieser Versuch unterscheidet sich von den übrigen durch seine Anordnung in drei Teile. Am zweiten Versuchstag injizierten wir unmittelbar vor der Wasserzufuhr 5 Einheiten Insulin und 2 Stunden später weitere 4 Einheiten. Am dritten Versuchstag dagegen injizierten wir nur einmal 8 Einheiten Insulin, und zwar 2 Stunden vor der Wasseraufnahme. Durch diese Anordnungen wollten wir Aufschluß über die Dauer der Insulinwirkung gewinnen. Übereinstimmend mit den vorausgehenden Versuchen erzeugt Insulin hier neben der absoluten Diuresehemmung eine Zusammendrängung des diuretischen Effekts auf einen kürzeren Zeitraum, der am zweiten Versuchstag am ausgesprochensten ist. Während am ersten Tage ohne Insulin um 11 und 12 Uhr je über 300 ccm Harn ausgeschieden werden, sistiert am zweiten Tage die Diurese schon nach 10 Uhr 30 Minuten vollkommen bis zum Ende des Versuchs; der dritte Versuchstag unterscheidet

Tabelle XXIII.
H. V. 28 Jahre. — Insulinwirkung beim Normalen. Trinkversuch ohne und mit Insulin.

Zeit	Körpergewicht	Harn							Extrarenale Ausscheidung	Blut			Bemerkungen
		Menge	Spezifisches Gewicht	Na Cl		p_H	Acidität			Erythrozyten	Serumeiweiß	Na Cl	
				Proz.	g		Proz.	total			Proz.	g-Proz.	
1. Versuchstag													
8h30′	61 870	—	—	—	—	—	—	—	—	5,24	8,58	0,476	8h35′ bis 8h45′ 1500 ccm Wasser nüchtern
9 0	63 360	—	—	—	—	—	—	—	(10)	—	—	—	
9 30	63 160	161	1009,5	0,287	0,462	7,0	3,19	5,14	39	4,35	8,82	0,477	
10 0	62 770	337	1003,5	0,089	0,300	7,15	0,20	0,67	53	—	—	—	
10 30	62 480	345	1003,0	0,077	0,266	7,2	0,20	0,69	45	5,08	7,85	0,477	
11 30	61 810	534	1003,5	0,085	0,454	7,15	0	0	136	5,17	8,28	0,519	
12 30	61 700	54	1014,0	0,286	0,154	6,95	7,09	3,83	56	5,01	7,85	0,483	
Summe in g . .	1 660	1431	—	—	1,636	—	—	10,33	229	—	—	—	
Summe in Proz.	**110,66**	**95,4**	—	—	—	—	—	—	**15,26**	—	—	—	
2. Versuchstag													
8h30′	61 600	—	—	—	—	—	—	—	—	5,67	7,93	0,464	8h30′ 12 E. Insulin subkutan 8h35′ bis 8h45′ 1500 ccm Wasser nüchtern
8 45	63 090	—	—	—	—	—	—	—	(10)	—	—	—	
9 30	62 885	142	1009,0	0,289	0,410	7,0	0,10	0,14	63	5,10	8,32	0,420	
10 0	62 525	298	1003,0	0,077	0,229	7,0	0	0	62	—	—	—	
10 30	62 225	290	1003,5	0,064	0,186	7,15	0	0	10	5,42	7,85	0,483	Blässe, Tremor, Kältegefühl, leichte Schweiße, 12h kein Harn
11 30	61 870	284	1006,0	0,114	0,324	7,1	0,14	0,4	71	4,97	7,75	0,474	
12 30	61 715	49	1018,0	0,514	0,252	**5,65**	**3,8**	**1,85**	106	5,21	7,51	0,474	
Summe in g . .	1 375	1063	—	—	1,401	—	—	**2,39**	312	—	—	—	
Summe in Proz.	**91,67**	**70,87**	—	—	—	—	—	—	20,8	—	—	—	

Tabelle XXIV.

E. F. 9 Jahre. — Insulinwirkung beim Normalen. Trinkversuch ohne und mit Insulin.

Zeit	Körpergewicht	Harn							Extrarenale Ausscheidung	Blut		Bemerkungen
		Menge	Spezifisches Gewicht	NaCl		p_H	Acidität			Serumeiweiß	NaCl	
				Proz.	g		Proz.	total		Proz.	g-Proz.	
1. Versuchstag												
8h30'	24 250	—	—	—	—	—	—	—	—	9,38	0,431	8h 30' bis 9h 800 ccm Wasser nüchtern
9 0	25 040	—	—	—	—	—	—	—	(10)	—	—	
9 30	24 800	192	1008	0,289	0,555	6,17	2,12	4,07	48	8,92	0,430	
10 0	24 400	343	1004	0,087	0,298	6,45	0,76	2,61	57	—	—	
10 30	24 110	280	1003,5	0,071	0,199	6,6	0,4	1,12	10	8,92	0,437	
11 30	23 940	118	1006	0,270	0,319	5,9	4,56	5,38	52	8,71	0,448	
12 30	23 930	—	—	—	—	—	—	—	10	8,35	0,448	Kein Harn
Summe in g . .	1 110	933	—	—	1,371	—	—	13,18	177	—	—	
Summe in Proz.	138 3/4	116 5/8	—	—	—	—	—	—	22 1/8	—	—	
2. Versuchstag												
8h30'	24 300	—	—	—	—	—	—	—	—	8,47	0,496	8h 35' 8 E. Insulin subkutan
9 0	25 065	—	—	—	—	—	—	—	(35)	—	—	8h 35' bis 9h 800 ccm Wasser nüchtern
9 30	25 000	—	—	—	—	—	—	—	65	8,67	0,508	9h 30' kein Harn
10 0	24 730	238	1007	0,371	0,883	6,0	2,04	4,86	32	—	—	
10 30	24 170	546	1002,5	0,061	0,333	6,6	0,32	1,75	14	8,15	0,502	10h bis 12h Tremor
11 30	24 140	—	—	—	—	—	—	—	30	8,75	0,512	Kein Harn
12 30	24 980	102	1010	0,617	0,629	5,6	10,8	11,02	58	8,41	0,449	
Summe in g . .	1 085 (925)	886 (784)	—	—	1,845 (1,216)	—	—	17,63 (6,61)	199 (141)	—	—	
Summe in Proz.	135 5/8 (115 5/8)	110 3/4 (98)	—	—	—	—	—	—	24 7/8 (17 5/8)	—	—	

Tabelle XXV.

W. Ch. 5 Jahre. — Insulinwirkung beim Normalen. Trinkversuch ohne und mit Insulin.

Zeit	Körpergewicht	Harn: Menge	Harn: Spezifisches Gewicht	Harn: NaCl Proz.	Harn: NaCl g	Harn: p_H	Harn: Acidität Proz.	Harn: Acidität total	Extrarenale Ausscheidung	Blut: Serumeiweiß Proz.	Blut: NaCl g-Proz.	Bemerkungen
1. Versuchstag												
8h 0′	17 790	—	—	—	—	—	—	—	—	9,02	0,554	8h bis 8h30′ 800 ccm Wasser nüchtern
8 30	18 590	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	
9 0	18 490	67	1011	0,603	0,404	6,9	0,7	0,47	33	8,73	0,525	
9 30	18 330	113	1003	0,160	0,181	7,1	0,3	0,34	47	—	—	
10 0	18 090	182	1003,5	0,070	0,127	7,15	0,11	0,20	58	8,72	0,545	
11 0	17 690	380	1002	0,051	0,196	7,15	0,11	0,42	20	9,26	0,583	
12 0	17 350	313	1002	0,072	0,225	7,25	0,05	0,16	27	8,53	0,657	
Summe in g . .	1 240	1055	—	—	1,133	—	—	1,59	185	—	—	
Summe in Proz.	155	131,9	—	—	—	—	—	—	23,1	—	—	
2. Versuchstag												
8h 0′	17 535	—	—	—	—	—	—	—	—	8,89	0,452	8h 5 E. Iusulin intramuskulär
8 30	18 310	—	—	—	—	—	—	—	(25)	—	—	8h bis 8h30′ 800 ccm Wasser nüchtern
9 0	18 065	220	1006	0,331	0,728	7,45	- 0,8	- 0,176	25	8,37	0,451	
9 30	17 810	239	1001	0,056	0,134	7,15	0,5	1,2	16	—	—	
10 0	17 530	258	1002	0,030	0,077	7,15	0,25	0,65	22	8,86	0,455	10h 4 E. Insulin intramuskul., Harn von 10h30′, 11h und 12h kann kein Harn gelassen werden
11 0	17 280	236	1001,5	0,029	0,068	7,2	0,1	0,24	14	9,23	0,486	
12 0	17 270	—	—	—	—	—	—	—	10	9,23	0,447	
Summe in g . .	1 040	953	—	—	1,007	—	—	1,91	87	—	—	
Summe in Proz.	130	119¹/₈	—	—	—	—	—	—	10⁷/₈	—	—	
3. Versuchstag												6h vorm. 8 E. Insulin intramuskulär
8h 0′	17 740	—	—	—	—	—	—	—	—	8,71	0,517	
8 30	18 520	—	—	—	—	—	—	—	(20)	—	—	8h bis 8h30′ 800 ccm Wasser nüchtern
9 0	18 380	126	1007	0,120	0,151	7,5	- 1,04	- 1,31	14	8,96	0,554	
9 30	18 060	305	1001	0,039	0,119	7,1	0	0	15	—	—	
10 0	17 790	262	1002	0,036	0,094	7,1	0,16	0,42	8	9,05	0,489	
11 0	17 500	273	1003	0,041	0,112	7,1	0,24	0,66	17	9,10	0,502	Harn von 10h 30′, 11h kein Harn
12 0	17 405	76	1013	0,878	0,667	7,35	1,84	1,40	19	9,14	0,496	
Summe in g . .	1 115 (1 020)	1042 (966)	—	—	1,143 (0,476)	—	—	1,17 (0,23)	73 (64)	—	—	
Summe in Proz.	[illegible]	[illegible]							[illegible]			

sich vom zweiten nur dadurch, daß um 12 Uhr nach einer Diuresepause ähnlich wie in früheren Versuchen wieder eine geringe Menge allerdings konzentrierteren Harns ausgeschieden wird. Diese nachträgliche Wasserausscheidung ist am zweiten Versuchstag offenbar durch die zweite Insulininjektion um 10 Uhr hintangehalten worden. Die Insulinwirkung hält also ziemlich lange an, aber sie ist in den ersten Stunden nach der Injektion am stärksten, und *es gelingt durch eine nachfolgende Injektion, den wasserretinierenden Effekt der ersten aufrecht zu erhalten.*

In diesem Versuch tritt zum ersten Male neben der Abnahme der renalen auch eine *Verminderung der extrarenalen Wasserausscheidung* deutlich zutage. Im Gegensatz zu den übrigen Versuchspersonen war dieses Kind durch Insulin in keiner Weise in seinem Allgemeinbefinden gestört. Wir nehmen an, daß die Erhöhung des Wasserbindungsvermögens unter Insulin im allgemeinen auch zu einer Einschränkung der extrarenalen Wasserabgabe führt, und dies um so mehr, je größer die Wasseravidität der Gewebe ist. Diese Grundwirkung wird verdeckt, wenn leichte Erscheinungen einer Insulinintoxikation auftreten und die Schweißsekretion erregt wird.

Dem Insulin kommt demnach eine deutliche antidiuretische Wirkung zu. *Die diuretische Wirkung peroral zugeführten Wassers wird nicht nur absolut eingeschränkt, sondern auch auf einen kürzeren Zeitraum zusammengedrängt.* Die Kurve der renalen Wasserausscheidung kann dabei durch Insulin verschieden verändert werden. Wir fanden zwei Haupttypen der Modifikation:

1. Starke Verkürzung der Kurve bei gleicher Höhe;

2. Abflachung der Kurve bei geringerer Verkürzung. Der Summationseffekt ist in beiden Fällen der gleiche. Der Verminderung der renalen Wasserausscheidung geht regelmäßig eine mehr oder weniger ausgesprochene *Einschränkung der absoluten Kochsalzausscheidung* parallel. Die *extrarenale Ausscheidung* wird in Fällen, in denen das Insulin zu leicht toxischen Erscheinungen führt, *infolge einer merklichen Erhöhung der Hautwasserabgabe* (Schweißausbruch) *gesteigert.* Bleiben diese Allgemeinerscheinungen aus, so wird *auch die extrarenale Wasserabgabe stark eingeschränkt* (Tabelle XXV). Die Wasser- und Kochsalzretention führt nicht zu entsprechenden Blutveränderungen. Vielmehr ist die *Blutkonzentration* — die geringe Hydrämie im Falle *H. V.* ausgenommen — im allgemeinen *unverändert,* gelegentlich sogar erhöht und der *Blutkochsalzspiegel* entweder *unverändert oder erniedrigt.* Die antidiuretische Wirkung des Insulins kann also nicht auf eine Sperre in der Niere für die Wasser- und Kochsalzausscheidung zurückgeführt werden, ihren *Angriffspunkt* müssen wir vielmehr in die *Gewebe* verlegen. Diese erhalten durch Insulin die Fähigkeit, Wasser und Kochsalz an sich zu ziehen und festzuhalten. War der Sättigungsgrad der Gewebe an diesen Stoffen schon vorher ein hoher, so wird absolut weniger retiniert und das Blut kann hydrämisch werden. Schließlich wurde

die *Säureausscheidung* mit dem Harn durch Insulin in der Regel stark *herabgesetzt*, ein Befund, den der eine von uns schon an anderer Stelle mitgeteilt hat, der aber in diesen Versuchen durch die Konzentrationsveränderungen mitbedingt ist.

Vergleichen wir die Insulinwirkungen mit der Wirkung anderer Hormone, so drängt sich uns ein weitgehender *Antagonismus zwischen Insulin und Thyreoidin* auf. Beide haben den Angriffspunkt in den Geweben gemeinsam und entfalten dort entgegengesetzte Wirkungen: Insulin führt zur extrarenalen Wasserretention, Thyreoidin zur Wassermobilisierung und Entsalzung der Gewebe. ***Keineswegs ist die Wirkung des Insulins mit der des Hypophysenhinterlappens identisch***, wenn auch manche Ähnlichkeiten bestehen. Beiden gemeinsam ist der antidiuretische Effekt. Aber Hypophysenextrakt führt im allgemeinen nicht zu einer gleichzeitigen Kochsalzretention. Die Hydrämie und die gesteigerte extrarenale Ausscheidung, sowie die Zweiphasigkeit des diuretischen Effekts, Charakteristika der Hypophysinwirkung, vermissen wir beim Insulin. Schließlich hat das Hypophysenhormon im Gegensatz zum Insulin nicht nur einen extrarenalen, sondern wahrscheinlich auch einen renalen Angriffspunkt.

III. Teil.

Die Ergebnisse des zweiten Teiles beweisen, daß die diuretische Wirkung abundanter Wasserzufuhr durch Insulin abgeschwächt wird, offenbar infolge einer Erhöhung des Wasserbindungsvermögens der Gewebe. Wir haben unsere Beobachtungen nur über 4 Stunden ausgedehnt und wissen darum nicht, was nach Abklingen der Insulinwirkung geschieht. Es ist möglich, daß das anfangs retinierte Wasser und Kochsalz später wieder ausgeschieden wird, so daß das Insulin den diuretischen Effekt des Wasserstoßes nur verzögerte. Zudem wurde in diesen Versuchen der Wasserhaushalt durch zwei verschiedene Faktoren beeinflußt. Wir dürfen sie also nicht zur Beantwortung unserer Grundfrage heranziehen: ob das Insulin an sich das Wasserbindungsvermögen auch des nichtdiabetischen Organismus erhöht und zu einer Wasserretention führt. Nur Bilanzversuche bei konstanter Ernährung und gleichbleibender Flüssigkeitszufuhr konnten auf diese Fragen eine Antwort geben. Wir führen hier drei Protokolle aus unseren Untersuchungen an. Die Versuchsanordnung wurde im methodischen Teil eingehend besprochen. Zu diesen mehrtägigen Versuchen wählten wir vollkommen gesunde Säuglinge aus, die einen guten Ernährungszustand und einen idealen Gewebsturgor zeigten.

Wir können uns kurz fassen, da die Tabellen alle Einzelheiten leicht erkennen lassen (Tabellen XXVI bis XXVIII). *Wir sahen in*

keinem Falle während der dreitägigen Insulinperiode eine Wasserretention oder eine Körpergewichtszunahme, die über das bei einem gut gedeihenden Säugling gewohnte Maß hinausging. *Weder die renale noch die extrarenale Wasserabgabe zeigte unter Insulin eine irgendwie bemerkenswerte Veränderung.* Die *Cl-Bilanz* war bei allen Versuchskindern in der Vor-, Haupt- und Nachperiode regelmäßig positiv und wurde durch Insulin *in keiner Weise* entscheidend *verändert*. Die Cl-Retention war in der Insulinperiode sogar häufiger vermindert als vermehrt. Als einzige Andeutung einer Insulinwirkung sahen wir ein gesetzmäßiges Verhalten der Cl-Bilanzen an den einzelnen Versuchstagen. Fast durchweg war die Cl-Retention am ersten Insulintage am höchsten; sie nahm mit zunehmender Sättigung der Gewebe in den folgenden Tagen ab und erreichte am letzten Insulintag negative oder annähernd negative Werte. Umgekehrt nahm die Cl-Retention in der Nachperiode wieder progressiv zu. Das Blut zeigte *keine charakteristischen Veränderungen*. Die Cl-Werte blieben in engen Grenzen konstant. Die Blutkonzentration ließ in den Hb.- und E. Z.-Werten keine gesetzmäßigen Veränderungen erkennen; der S. E.-Gehalt zeigte regellose Schwankungen.

Es gelingt also beim nichtdiabetischen eutrophischen Säugling nicht, das Wasserbindungsvermögen durch Insulin zu erhöhen und eine Wasser- und Cl-Retention hervorzurufen. Bei den optimalen Verhältnissen, die schon vor der Insulinapplikation vorlagen, war dieses negative Resultat nicht überraschend. Während bei den Wasserstoßversuchen dem Insulin sich wenigstens die Möglichkeit bot, dem demineralisatorischen und wassermobilisierenden Effekt der Wasserzufuhr entgegenzutreten und so eine relative Wasser- und Kochsalzretention zu bewirken, blieb dem Insulin hier gewissermaßen nichts zu tun. Wir glauben wohl, daß jede einzelne Insulininjektion Veränderungen im Sinne der früheren Beobachtungen auslöste; aber diese mußten unter den optimalen Bedingungen des Organismus reversibel sein und nach Abklingen der Insulinwirkungen ins Gegenteil umschlagen, bis der ursprüngliche Gleichgewichtszustand wieder erreicht war. Es könnte verwundern, daß wir in unseren Bilanzversuchen nicht einmal die Hydrämie und Hyperchlorämie feststellen konnten, die doch in der Versuchsreihe des ersten Teiles ein regelmäßiger Befund waren. Aber diese letzten Blutwerte sind jeweils morgens am nüchternen Versuchskind gewonnen, zu einer Zeit, in der es nicht unter aktueller Insulinwirkung stand.

Wir beobachteten schließlich die Wirkung des Insulins rein klinisch bei einer Reihe von Säuglingen, die in einem weniger idealen Zustand waren. Wir wählten Kinder, die einen längeren Gewichtsstillstand aufwiesen und, ohne ausgesprochen hypotrophisch zu sein, einen mangelhaften Gewebsturgor zeigten. Ohne Änderungen der übrigen Bedingungen injizierten wir ihnen dreimal täglich 2 bis 5 Einheiten

Tabelle XXVI. G.

Datum	Körpergewicht	Einfuhr: Menge und Art der Nahrung	Einfuhr: Cl mg	Harn: Menge	Harn: Cl mg	Harn: N	Harn: A + NH_3	$\frac{A + NH_3}{N} \times 10$
11./12. I.	6070	1000 ccm $^2/_3$ Milch 5 Proz. R. Z.	756	685	676	2071	190,4	9,2
12./13. I.	6110		756	735	748	2073	164,1	7,9
13./14. I.	6140		852	680	611	2000	180,7	9,0
Vorperiode: Mittelwerte			788	700	678	2048	178,4	8,7
14./15. I.	6150	1000 ccm $^2/_3$ Milch 5 Proz. R. Z.	852	680	579	2002	156,2	7,8
15./16 I.	6210		852	685	686	2287	138,0	6,0
16./17. I.	6200		767	685	740	2293	149,6	6,5
Hauptperiode: Mittelwerte			824	683	668	2194	147,9	6,8
17./18. I.	6100	1000 ccm $^2/_3$ Milch 5 Proz. R. Z.	767	710	696	2151	174,9	8,1
18./19. I.	6150		767	725	639	2568	170,1	6,6
Nachperiode: Mittelwerte			767	718	668	2359	172,5	7,35

Tabelle XXVII. H. G.

Datum	Körpergewicht	Einfuhr: Menge und Art der Nahrung	Einfuhr: Cl mg	Harn: Menge	Harn: Cl mg	Harn: N	Harn: A + NH_3	$\frac{A + NH_3}{N} \times 10$
23./24. I.	7730	1000 ccm $^2/_3$ Milch 7 Proz. S. Z. 3 Proz. Mehl	1186	625	885	2213	198,7	8,9
24./25. I.	7770		1186	570	921	1972	259,6	13,1
25./26. I.	7810		1186	665	1303	2114	226,0	10,7
Vorperiode: Mittelwerte			1186	620	1036	2100	228,1	10,9
26./27. I.	7790	1000 ccm $^2/_3$ Milch 7 Proz. S. Z. 3 Proz. Mehl	1186	560	962	1926	238,6	12,4
27./28. I.	7880		1186	630	1051	—	240,6	—
28./29. I.	7820		1186	600	1206	1860	246,6	13,3
Hauptperiode: Mittelwerte			1186	597	1073	1893	241,9	12,8
29./30. I.	7900	1000 ccm $^2/_3$ Milch 7 Proz. S. Z. 3 Proz. Mehl	1186	580	1029	1682	243,2	14,4
30./31. I.	7900		1186	600	988	1812	252,6	13,9
31.I/1. II.	7980		1186	570	809	1881	258,8	13,8
Nachperiode: Mittelwerte			1186	583	942	1792	251,5	1,40

Tabelle XXVIII.

Datum	Körpergewicht	Einfuhr: Menge und Art der Nahrung	Einfuhr: Cl mg	Harn: Menge	Harn: Cl mg	Harn: N	Harn: A + NH_3	$\frac{A + NH_3}{N} \times 10$
23./24. I.	6880	1000 ccm $^2/_3$ Milch 5 Proz. S. Z. 2 Proz. Mehl	1124	565	758	1915	205,3	10,6
24./25. I.	6940		1124	530	741	1866	269,4	14,4
25./26. I.	6980		1124	600	988	1884	236,4	13,1
Vorperiode: Mittelwerte			1124	565	829	1888	237,0	12,7
26./27. I.	7040	1000 ccm $^2/_3$ Milch 5 Proz. S. Z. 2 Proz. Mehl	1124	550	788	1749	237,4	13,5
27./28. I.	7080		1124	575	779	—	248,6	—
28./29. I.	7100		1124	640	1168	1754	224,2	12,8
Hauptperiode: Mittelwerte			1124	588	912	1751	236,7	13,2
29./30. I.	7080	1000 ccm $^2/_3$ Milch 5 Proz. S. Z. 2 Proz. Mehl	1124	700	1213	1876	287,0	15,3
30./31. I.	7040		1124	640	1054	1894	291,2	15,3
31.I./1.II.	7040		1124	565	662	2028	270,4	13,3
Nachperiode: Mittelwerte			1124	635	976	1933	282,9	14,6

. 8. VIII. 1924, gesund.

Stuhl Wasser-gehalt	Stuhl Cl mg	Ges. (Harn + Stuhl) Wasser	Ges. (Harn + Stuhl) Cl mg	Extrarenale Wasserabgabe	Cl-Bilanz	Blut Erythrozyten	Blut Serumeiweiß Proz.	Blut Cl g-Proz.	Bemerkungen
		713	680,8	247	+ 75,2	4,02	7,20	0,324	Ohne Insulin
	14,5	744	752,8	226	+ 3,2	4,11	6,85	0,319	
		695	615,8	295	+ 236,2	4,28	7,83	0,305	5 g gespuckt
	4,83	717	682,8	256	+ 104,9	4,14	7,29	0,316	
		680	581,3	260	+ 270,7	4,18	9,78	0,321	3 × 4 E. Insulin (Wellcome)
	6,98	685	688,3	325	+ 163,7	4,24	7,51	0,341	3 × 4 E. Insulin (Wellcome)
		697	742,3	403	+ 24,7	4,42	7,46	0,361	3 × 4 E. Insulin (Wellcome)
	2,33	687	670,3	329	+ 153,0	4,28	8,25	0,341	
	4,49	725	698,2	225	+ 68,8	4,38	7,63	0,339	Ohne Insulin
		739	641,2	241	+ 125,8	—	—	—	
5	2,24	732	670,0	233	+ 97,3	4,38	7,63	0,339	

20. VI. 1924, gesund.

Stuhl Wasser-gehalt	Stuhl Cl mg	Ges. (Harn + Stuhl) Wasser	Ges. (Harn + Stuhl) Cl mg	Extrarenale Wasserabgabe	Cl-Bilanz	Blut Hb Proz.	Blut Serumeiweiß Proz.	Blut Cl g-Proz.	Bemerkungen
		654	888,2	306	+ 297,8	65	7,42	0,323	Ohne Insulin
	9,7	588	924,3	372	+ 261,7	65	7,11	0,311	
		695	1306,2	325	— 120,2	62	6,45	0,328	
	3,2	626	1039,2	334	+ 146	64	6,99	0,321	
		588	963	322	+ 223	72	7,02	0,335	3 × 4 E. Insulin
	3,0	649	1052	411	+ 134	62	7,08	0,310	3 × 4 E. Insulin
		600	1207	320	— 21	59	6,98	0,319	3 × 5 E. Insulin
	1,0	613	1074	351	+ 112	64	7,03	0,321	
		615	1031	385	+ 155	62	6,98	0,296	Ohne Insulin
1	6,1	631	990	289	+ 196	—	—	—	
2		632	811	398	+ 375	58	7,20	0,307	
	2,0	626	944	357	+ 242	60	7,09	0,302	

. 25. VII. 1924, gesund.

Stuhl Wasser-gehalt	Stuhl Cl mg	Ges. (Harn + Stuhl) Wasser	Ges. (Harn + Stuhl) Cl mg	Extrarenale Wasserabgabe	Cl-Bilanz	Blut Hb Proz.	Blut Serumeiweiß Proz.	Blut Cl g-Proz.	Bemerkungen
5		590	763,3	350	+ 360,7	102	7,46	0,324	Ohne Insulin
3	15,8	563	746,3	397	+ 377,7	88	6,88	0,300	
8		678	993,3	262	+ 130,7	102	6,88	0,313	
5	5,3	610	834,3	336	+ 289,7	97	7,07	0,312	
6		616	792,4	344	+ 331,6	83	7,20	0,327	3 × 4 E. Insulin (Wellcome)
6	13,2	631	783,4	349	+ 340,6	94	6,90	0,314	3 × 4 E. Insulin (Wellcome)
8		688	1172,4	332	— 48,4	76	7,02	0,308	3 × 5 E. Insulin (Wellcome)
7	4,4	645	916,4	342	+ 207,9	84	7,04	0,316	
8		748	1216,3	292	— 92,3	98	7,16	0,305	Ohne Insulin
0	9,8	670	1057,3	330	+ 66,7	—	—	—	
7		612	665,3	438	+ 458,7	106	7,32	0,314	
12	3,3	677	979,3	353	+ 144,4	102	7,24	0,310	

Insulin. Auch hier sahen wir in keinem Falle eine eindeutige Körpergewichtszunahme. Wo das Insulin zu leicht toxischen Erscheinungen führte, was bei Säuglingen im ersten Trimenon schon bei zwei Einheiten vorkommen kann, sahen wir sogar Gewichtssenkungen.

Schlußbemerkungen.

Wir glauben, die scheinbaren Widersprüche zwischen einigen Befunden durch die verschiedenen Versuchsbedingungen und den verschiedenen Zustand der Versuchstiere und Versuchspersonen hinreichend aufgeklärt zu haben. Der anfänglichen Deutung unserer Blutbefunde im Tierversuch, daß nämlich die Hydrämie und Hyperchlorämie nach Insulin durch den Einstrom einer eiweißarmen und kochsalzreichen Flüssigkeit aus den Geweben in die Blutbahn zustande kommt, möchten wir nur eine ganz begrenzte Geltung für jene Fälle zuerkennen, in denen Hungertiere durch Insulin in den hypoglykämischen Komplex gerieten. Eine so gerichtete Wasserverschiebung muß bei intakter Nierenfunktion eine Diurese veranlassen. Und daß unter bestimmten Bedingungen diese Wirkung möglich ist, dafür sprechen die Körpergewichtsabnahmen, die wir an jungen Säuglingen beobachteten, bei denen durch Insulininjektion im nahrungsfreien Intervall hypoglykämische Symptome ausgelöst wurden. Im allgemeinen aber vollzieht sich der Flüssigkeitsstrom unter Insulin in umgekehrter Richtung nach den Geweben hin, und erst wenn diese in ihrem Wasserbindungsvermögen erschöpft sind, kann sich auch das Blut mit Wasser anreichern. Ob diese Hydrämie durch kolloidale Veränderungen der Blutflüssigkeit zustande kommt, vermögen wir auf Grund unserer Untersuchungen nicht zu sagen.

Nachdem unsere Arbeit in ihren wesentlichen Punkten abgeschlossen war, erschienen die interessanten Studien *O. Kleins* (15) über den Wasserwechsel beim Diabetes mellitus und über die Einwirkung des Insulins auf denselben. Wo wir uns berühren, haben wir auf die mit den unseren übereinstimmenden Resultate dieser Arbeit hingewiesen. In einigen Abschnitten bedeutet sie die klinisch weit interessantere Fortsetzung unserer Untersuchungen.

Unser Arbeitsziel war, die Insulinwirkung auf den nichtdiabetischen wasserverarmten Organismus zu studieren. Dazu haben wir bisher nur die physiologische Vorarbeit geleistet. Die experimentelle Bearbeitung unserer Hauptfrage ist inzwischen durch klinisch-therapeutische Versuche überholt worden. Amerikanische und englische Autoren [*Mariott* (19), *Barbour* (20) u. a.] und in Deutschland *Priesel* und *Wagner* (21) haben chronische und akut ernährungsgestörte Säuglinge mit Insulin oder Insulin- und Traubenzuckerinfusionen

behandelt und berichten über gute Erfolge[1]). Wir haben uns von einer sicheren Wirkung bisher nicht überzeugen können und halten auch die beiden von *Priesel* und *Wagner* kürzlich mitgeteilten Fälle nicht für unbedingt beweisend, wenn wir auch ihren theoretischen Ausführungen voll zustimmen.

Die Schwierigkeiten, die sich in solchen Fällen für die richtige Beurteilung des therapeutischen Erfolges ergeben, liegen auf der Hand. Hier müssen an die Stelle der rein klinischen Beobachtung exakte Untersuchungen des Wasserhaushalts und Bilanzversuche treten, an die Stelle kombinierter Therapie klare Versuchsbedingungen. In dieser Richtung setzen wir unsere Studien fort.

Zusammenfassung.

1. Beim normalen, nüchternen Kaninchen führt Insulin regelmäßig zu einer Hyperchlorämie und Hydrämie. Es wird eingehend gezeigt, daß diese Veränderungen nicht als Folge der Hypoglykämie und als Ergebnis rein osmoregulatorischer Vorgänge im Blute aufgefaßt werden können. Die Wasser- und Kochsalzverschiebungen stehen vielmehr in enger Beziehung zu dem intermediären Kohlehydratstoffwechsel in der Weise, daß das Insulin durch Glykogenanreicherung der Leber und Muskulatur das Wasserbindungsvermögen des Organismus erhöht. Der Angriffspunkt des Insulins ist in erster Linie in den Geweben zu suchen. Sobald diese mit Wasser und Kochsalz gesättigt sind, kann sich auch das Blut mit Wasser anreichern.

2. Im *Volhard*schen Wasserversuch wirkt Insulin stark antidiuretisch. Die renale Ausscheidung wird nicht nur absolut eingeschränkt, sondern auch auf einen kürzeren Zeitraum zusammengedränkt. Gleichzeitig wird die Kochsalzausscheidung mit dem Harn herabgesetzt. Das Blut ertährt dabei keine wesentlichen Veränderungen. Es wird auf den Antagonismus zwischen Insulin- und Thyreoidinwirkung auf den Wasserwechsel hingewiesen. Zwischen Insulin und Adrenalin besteht in dieser Hinsicht nicht der gleiche Antagonismus wie für den Kohlehydratstoffwechsel. Die Wirkung des Insulins auf den Wasserhaushalt ist mit der des Hypophysenhinterlappens nicht identisch.

3. Ohne gleichzeitige Wasserbelastung gelingt es beim stoffwechselgesunden, eutrophischen Säugling nicht, das Wasserbindungsvermögen durch Insulin zu erhöhen. Die Wasserausscheidung und Chlorbilanz bleiben unverändert.

---

[1]) Vgl. hierzu auch die Diskussionsbemerkungen *Freudenbergs, Györgys* und *Rosenbaums*, Verhandl. d. 35. Vers. d. deutsch. Gessellsch. f. Kinderh., Innsbruck 1924, S. 83. Leipzig 1925.

Literatur.

1) *Vollmer*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **41**, 654, 1924. — 2) *Priesel-Wagner*, Zeitschr. f. Kinderheilk. **38**, 103, 1924. — 3) *Meyer-Bisch*, diese Zeitschr. **152**, 286, 1924. — 4) *Nonnenbruch*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **26**, 119, 1924. — 5) *Magnus*, Arch. f. exper. Pathol. u. Pharm. **42**, 250, 1899; **44**, 68 u. 396, 1900. — 6) *Nonnenbruch*, ebendaselbst **86**, 281, 1920; **89**, 200, 1921; **91**, 322, 1921. — 7) *Hofmeier*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **35**, 191, 1923. — 8) *Glaser*, Deutsch. med. Wochenschr. 1923, Nr. 8. — 9) *Böhm*, diese Zeitschr. **16**, 313, 1909. — 10) *Herrick*, Journ. of laborat. a. clin. med. **9**, 458, 1924. — 11) *Hess*, Deutsch. Arch. f. klin. Med. **79**, 128, 1903. — 12) *Erb* jun., ebendaselbst 88, 36, 1907. — 13) *Dudley-Marrian*, The biochem. Journ. **17**, 435, 1923. — 14) *Brugsch-Benatt-Horsters-Katz*, diese Zeitschr. **147**, 117, 1924. — 15) *Klein*, Zeitschr. f. d. ges. exper. Med. **48**, 665, 1924. — 16) *Mautner* und *Pick*, Münch. med. Wochenschr. 1915, S. 1141; Arch. f. exper. Pathol. u. Pharmakol. **97**, 306, 1923. — 17) *Mautner*, Wien. Arch. f. inn. Med. **7**, 251, 1923. — 18) *Veil*, Ergebn. d. inn. Med. u. Kinderheilk. **23**, 708, 1923. — 19) *Mariott*, Journ. of the Amer. med. assoc. **83**, 600, 1924. — 20) *Barbour*, Arch. of pediatr. **41**, 707, 1924. — 21) *Priesel-Wagner*, Klin. Wochenschr. **4**, 489, 1925. — 22) *Behrendt-Hopmann*, ebendaselbst **3**, 2233, 1924.

Die quantitative Bestimmung des primären Ätherextrakts des Blutes.

Einige erläuternde und korrigierende Bemerkungen.

Von

H. J. Bing und H. Heckscher.

(Aus der II. Abteilung des Kommunehospitals und dem Blegdamshospital, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 24. März 1925.)

Nachdem neuerdings von *G. Blix* (1) eine auf experimentelle Untersuchungen gegründete Kritik der „nephelometrischen Methoden" zur Bestimmung des Fettgehalts im Blute, d. h. *Bloors* sowie *Bing* und *Heckschers* Methoden, veröffentlicht wurde, finden wir uns zur Darstellung folgender Bemerkungen veranlaßt.

Der Kern dieser Kritik unserer Methode liegt allenfalls in dem Nachweis, daß „der primäre Ätherextrakt" unter gewöhnlichen, d. h. normalen Umständen neben dem Neutralfett eine verhältnismäßig bedeutende Menge Cholesterin enthält. Indem wir uns auf die Angaben von *Gade* (2) stützten, waren wir in unseren früheren Publikationen der Meinung, daß der betreffende Extrakt hauptsächlich aus Neutralfett bestände; nach den Untersuchungen von *Blix* (1) und den von ihm zitierten Untersuchungen von *I. Bang* trifft diese Annahme jedoch nicht zu, und die *Bestandteile des „primären Ätherextrakts"* sind demnach: *Cholesterin, Neutralfett samt unbedeutende Spuren von Phosphatiden.* Deshalb heben wir hervor, daß wir anstatt der Bezeichnungen „Blutfett" oder „Blutfettmenge" hätten „primärer Ätherextrakt" bzw. „Extraktmenge" schreiben sollen. Denn die von uns veröffentlichten Untersuchungen (3) und (4) geben keine sicheren Aufschlüsse über die isolierte Neutralfettfraktion, sondern nur über die Ätherextraktmenge, d. h. die *kombinierte Neutralfett-Cholesterinmenge* unter den verschiedenen experimentellen Bedingungen.

Unter dieser Voraussetzung gestehen wir ferner, daß die Bezeichnungen „Hyperlipämie" und Hypolipämie" in den Fällen, wo die Extraktmenge größer bzw. kleiner als die normale ist, mißverständlich sind und deshalb wegfallen müssen.

Damit haben wir aber auch im wesentlichen die Punkte erledigt, deren Berechtigung wir dem Kritiker zugestehen, denn im übrigen

scheint uns die Kritik so beschaffen zu sein, daß der Kritiker unsere Methode nicht vollends durchgeprüft hat, und daß er auf die verschiedenen Fakta, die aus unseren gesamten veröffentlichten Untersuchungen hervorgehen, keine gehörige Rücksicht genommen hat.

Daß es, wie von *Blix* angegeben, unausführbar sei, die von uns benutzten Standardsuspensionen nach der Beschreibung in unserer diesbezüglichen Mitteilung (5) herzustellen, können wir nicht einräumen, indem wir hier auf eine von *Heckscher* (6) früher veröffentlichte Beschreibung der nephelometrischen Technik hinweisen, wo er über den Gebrauch des Nephelometers und der Standardserien, d. h. der Reihen von Suspensionen mit bekanntem und abnehmendem Trübungsgrad, nähere Aufschlüsse erteilt, und wo ein Schema zur Herstellung einer solchen Reihe abgedruckt ist. Vermittelst eines solchen Schemas und der Angaben in unserer Publikation (5): Standardsuspension Nr. 1 = 0,5 g fein pulverisiertes Kaolin in 1890 ccm klarer 15proz. Gelatine aufgeschlemmt, kann ein jeder sich unschwer eine Standardserie zubereiten, indem er, die Standardsuspension Nr. 1 als Ausgangspunkt benutzend, die übrigen Standardsuspensionen (Standardnummern) nach dem Schema durch Mischung von Nr. 1 mit Gelatine im angegebenen Verhältnissen herstellt.

Unsere Methode zur quantitativen Bestimmung des primären Ätherextrakts im Blute ist auf einer langen Reihe von Experimenten sowohl mit chemisch reinen „Fetten“ als mit natürlich vorkommendem vegetabilischem und animalischem Fett basiert. Da in der ursprünglichen Veröffentlichung unserer Methode von diesen Versuchen keine Rechenschaft abgelegt wurde, werden wir nun, durch die neuerdings erschienene Kritik veranlaßt, einige dieser Experimente anführen.

Versuch 1. Auf ein Stückchen Filtrierpapier [über vorhergehende Reinigung desselben siehe *Bing* und *Heckscher* (5)] bläst man wechselnde Mengen einer alkoholischen Lösung von *Triolein*. Das Papier wird getrocknet, zerschnitten, in ein Reagenzglas gesteckt und mit Äther in 24 Stunden bei 37° extrahiert. Der Äther wird in ein anderes Glas übergegossen, auf dem Wasserbad verdampft und der Rest in 0,5 ccm warmen absoluten Alkohols gelöst. Diese alkoholische Lösung wird in rinnendem Wasser gekühlt, mit 2,5 ccm einer 1proz. $BaCl_2$-Lösung gefällt und nephelometrisch gemessen (also durchweg dasselbe Verfahren wie bei der Blutanalyse!).

Nr.	Trioleinmenge mg	Neph. Wert „N. W.“	Berechnete Extraktmenge mg	Nr.	Trioleinmenge mg	Neph. Wert „N. W.“	Berechnete Extraktmenge mg
1	0,04	0,15	0,06	8	0,20	0,52	0,22
2	0,06	0,18	0,08	9	0,20	0,52	0,22
3	0,08	0,22	0,09	10	0,20	0,47	0,20
4	0,08	0,24	0,10	11	0,32	0,72	0,30
5	0,10	0,33	0,14	12	0,40	0,90	0,38
6	0,12	0,39	0,16	13	0,40	0,96	0,40
7	0,12	0,36	0,15	14	0,60	1,22	0,52

Bei allen Versuchen ist die Extraktmenge aus dem gefundenen nephelometrischen Wert nach der bei den Blutanalysen benutzten Tabelle berechnet worden [siehe *Bing* und *Heckscher* (5)].

Versuch 2. Entsprechender Versuch mit *Cholesterin.*

Nr.	Cholesterin mg	„N. W."	Berechnete Extraktmenge mg	Nr.	Cholesterin mg	„N. W."	Berechnete Extraktmenge mg
1	0,05	0,12	0,05	9	0,20	0,45	0,19
2	0,05	0,13	0,06	10	0,20	0,48	0,20
3	0,10	0,23	0,10	11	0,30	0,57	0,24
4	0,10	0,20	0,09	12	0,30	0,69	0,29
5	0,10	0,19	0,08	13	0,40	0,86	0,36
6	0,15	0,30	0,13	14	0,40	0,90	0,38
7	0,15	0,33	0,14	15	0,40	0,90	0,38
8	0,20	0,43	0,18	16	0,60	1,44	0,60

Versuch 3. Entsprechender Versuch mit gleichzeitiger Anwesenheit von *Triolein* und *Cholesterin.*

Nr.	Triolein mg	Cholesterin mg	Zusammen mg	„N. W."	Berechnete Extraktmenge mg
1	0,04	0,10	0,14	0,37	0,16
2	0,04	0,10	0,14	0,39	0,16
3	0,12	0,10	0,22	0,47	0,20
4	0,12	0,10	0,22	0,47	0,20
5	0,20	0,10	0,30	0,74	0,31
6	0,20	0,10	0,30	0,66	0,28
7	0,32	0,10	0,42	1,14	0,48
8	0,32	0,10	0,42	1,04	0,44
9	0,20	0,10	0,30	0,69	0,29
10	0,20	0,10	0,30	0,69	0,29
11	0,20	0,20	0,40	0,90	0,38
12	0,20	0,20	0,40	0,93	0,39
13	0,20	0,30	0,50	1,38	0,58
14	0,20	0,30	0,50	1,38	0,58
15	0,20	0,40	0,60	1,66	0,70
16	0,20	0,40	0,60	1,60	0,66

Es ergibt sich aus diesen Versuchen, daß das *Triolein* und *Cholesterin*, sowohl jedes für sich als auch zusammen in wechselndem Verhältnis miteinander gemischt, nach unserer Methode quantitativ bestimmt werden.

Mit *Tristearin* und *Tripalmitin* lassen sich aber die entsprechenden Versuche nicht ausführen, da diese Stoffe in kaltem Alkohol unlöslich sind; im folgenden Experiment haben wir versucht, diese Schwierigkeit zu umgehen.

Versuch 4a. Dasselbe Verfahren wie im vorigen Versuch mit *Triolein.*

Nr.	Trioleinmenge mg	„N. W."	Berechnete Extraktmenge mg
1	0,10	0,29	0,12
2	0,20	0,47	0,20
3	0,30	0,66	0,28
4	0,40	1,00	0,42

Versuch 4b. Nach Abdampfung des Äthers Lösung des Restes in warmem, absolutem Alkohol (50 bis 60°), Fällung mit *warmer* $BaCl_2$-Lösung (90 bis 100°), Kühlung in rinnendem Wasser, nephelometrische Bestimmung.

Nr.	Trioleinmenge mg	„N. W."	Berechnete Extraktmenge mg
1	0,10	0,29	0,12
2	0,20	0,48	0,20
3	0,30	0,72	0,30
4	0,40	0,97	0,41

d. h. derselbe Trübungsgrad, dasselbe Ergebnis bei beiden Verfahren.

Versuch 5. Dem Versuch 4b entsprechend, also Fällung der warmen. alkoholischen Lösung mit warmer $BaCl_2$-Lösung; Versuch mit *Tristearin* und *Tripalmitin.*

Nr.	Tristearinmenge mg	„N. W."	Berechnete Extraktmenge mg	Nr.	Tripalmitinmenge mg	„N. W."	Berechnete Extraktmenge mg
1	0,05	0,08	0,03	1	0,05	0,16	0,07
2	0,05	0,16	0,07	2	0,05	0,19	0,08
3	0,10	0,25	0,11	3	0,10	0,25	0,11
4	0,10	0,31	0,13	4	0,10	0,32	0,14
5	0,15	0,35	0,15	5	0,15	0,39	0,16
6	0,15	0,40	0,17	6	0,15	0,43	0,18
7	0,20	0,47	0,20	7	0,20	0,45	0,19
8	0,20	0,48	0,20	8	0,20	0,48	0,20
9	0,25	0,61	0,25	9	0,25	0,66	0,28
10	0,25	0,77	0,32	10	0,25	0,74	0,31

Also auch hier eine quantitative Bestimmung mittels der benutzten Skala, d. h. Tristearin und Tripalmitin zeigten denselben Trübungsgrad wie Triolein.

In bezug auf die mit natürlich vorkommenden Fetten unternommenen Versuche können wir auf die früher von uns veröffentlichten Analysen von *Milchproben,* deren Fettgehalt a. m. *Gerber* kontrolliert wurde, hinweisen, und folgender Versuch kann ebenfalls als Beispiel dienen.

Versuch 6. Dasselbe Verfahren wie bei den Blutanalysen; Versuch mit *Ol. amygdaloe*, mit *Cholesterin* und mit diesen beiden Substanzen gleichzeitig.

A. B.

Nr.	Ol. Amygdaloe mg	„N. W."	Berechnete Extraktmenge mg	Nr.	Cholesterin mg	„N. W."	Berechnete Extraktmenge mg
1	0,20	0,45	0,19	1	0,20	0,45	0,19
2	0,20	0,47	0,20	2	0,20	0,47	0,20
3	0,20	0,45	0,19	3	0,20	0,42	0,18

C.

Nr.	Ol. amygdaloe mg	Cholesterin mg	zusammen mg	„N. W."	Berechnete Extraktmenge mg
1	0,10	0,10	0,20	0,48	0,20
2	0,10	0,10	0,20	0,52	0,22
3	0,10	0,10	0,20	0,52	0,22

Auch hier fand man also Werte, die den hinzugesetzten Mengen der beiden Substanzen entsprachen.

Unserer Meinung nach bieten nun diese Versuche, wenn auch keine Evidenz, so doch jedenfalls eine Wahrscheinlichkeit dafür, daß die Ergebnisse unserer Analysen *„ein annähernd richtiges Maß für die Größe des primären Ätherextrakts des getrockneten Blutes"* liefern, daß also diejenigen Substanzen, welche sich überhaupt nach unserer Methode bestimmen lassen, nämlich Neutralfett und Cholesterin (diejenigen Substanzen, welche bei der primären Ätherextraktion aus dem Blute extrahiert werden, und die in kaltem Alkohol löslich sind), auch nach einem ihrer wirklichen Größe entsprechenden Maßstab gemessen werden. Auch stehen ja die von uns (3) gefundenen Normalwerte des primären Ätherextrakts (0,06 bis 0,12 Proz. mit 0,10 Proz. als häufigsten und Durchschnittswert) im Einklang mit den von *Blix* angegebenen Werten, welcher schreibt: *„The average figures given by Bang for normal fasting blood is 0,09 % free cholesterol and 0,02 % glycerids"* (d. h. zusammen 0,11 Proz.). *„In numerours determinations I have been able to confirm these results of Bang."*

In seiner Kritik macht *Blix* nun den Einwand, daß wir die Möglichkeit verschiedener Variationen in der Zusammensetzung des primären Ätherextrakts nicht in Betracht gezogen haben, und er bezweifelt, daß unsere Methode immer zu richtigen Ergebnissen führen wird, da er annimmt, daß so bedeutende Variationen in der Zusammensetzung des Extrakts vorliegen können, daß wir, falls wir uns unserer Skala bedienen, zu falschen Werten kommen werden.

Ein jeder wird leicht einsehen können, daß eine erschöpfende Beantwortung der hier aufgeworfenen Frage zurzeit unmöglich ist, da eben unsere Kenntnisse über die Variationen der Cholesterinmenge gegenüber den Glycerinestern sowie das Verhältnis zwischen den einzelnen Glycerinestern im Blute noch völlig unzureichend sind. Wir meinen nun, daß wir durch die hier erörterten Untersuchungen (s. z. B. Versuch 3, gleichzeitige Gegenwart von Triolein und Cholesterin in wechselnder Menge) soweit gelangt sind, uns eine Orientierung über die Frage des eventuellen Einflusses, den die wechselnde Zusammensetzung des Extrakts auf unsere Analysenergebnisse ausüben könnte, zu verschaffen, aber weiter können wir auf diesem Wege scheinbar nicht kommen. Deshalb haben wir mit den früher veröffentlichten Untersuchungen (3 und 4), die wir an normalen Individuen und Patienten der verschiedenen Krankheitsgruppen anstellten, einen anderen Weg eingeschlagen.

Vermittelst dieser früher mitgeteilten Untersuchungen, sind wir als die ersten zu *einer scharfen Abgrenzung des Normalen vom Pathologischen* gekommen, durch den Nachweis, daß die Menge des primären Ätherextrakts bei normalen Individuen innerhalb recht enger Grenzen schwankt, von uns als 0,06 bis 0,12 Proz. fixiert. Weiter fanden wir – neben einigen in der Klinik neuen Phänomenen — bei einer Reihe von Leiden vom Normalen abweichende Schwankungen, welche schon früher von anderen Forschern beobachtet waren. Daß diese unsere Beobachtungen von erhöhtem Interesse werden, wenn man einmal — wahrscheinlich recht bald — die exakte Bestimmung der Größe der einzelnen „Fettstoff"-fraktionen bei den pathologischen Schwankungen ausgeführt hat, geben wir gern zu; deshalb wird jedoch der Wert dieser Beobachtungen sowie derjenigen, welche wir in einigen folgenden Publikationen mitteilen werden, keineswegs restlos erlöschen.

Noch einige Punkte unserer Methodik müssen wir erwähnen, da sie von *Blix* in seiner Kritik berührt werden. In unserer ursprünglichen Beschreibung der Methode gaben wir an, daß man die nephelometrische Bestimmung von 15 Minuten bis 2 Stunden nach dem Zubereiten der Aufschlemmungen unternehmen kann; diesbezüglich teilt *Blix* einige Untersuchungen mit, welche er mit *Kobers* Nephelometer anstellte, aus denen es sich ergibt, daß die Aufschlemmungen, welche man durch Fällung des Trioleins und Cholesterins in alkoholischer Lösung mit einer wässerigen $BaCl_2$-Lösung gewinnt, einen Trübungsgrad, einen „N. W.", besitzen, welcher im Verlauf der angegebenen Zeit Veränderungen erleidet. Wir teilen deshalb folgenden Versuch mit, welcher mit verschiedenen entsprechenden Versuchen unserer Angabe zugrunde liegt.

Versuch 7. 30 verschiedene Blutproben nach unserer Methode analysiert; die nephelometrische Bestimmung 15, 45 und 120 Minuten nach dem Zubereiten der Aufschlemmungen.

Blutprobe Nr.	„N. W." nach Minuten			Berechnete Extraktmenge nach Minuten, mg		
	15	45	120	15	45	120
1	0,17	0,17	0,17	0,07	0,07	0,07
2	0,13	0,14	0,14	0,06	0,06	0,06
3	0,16	0,16	0,16	0,07	0,07	0,07
4	0,17	0,16	0,16	0,07	0,07	0,07
5	0,17	0,18	0,19	0,07	0,08	0,08
6	0,19	0,19	0,18	0,08	0,08	0,08
7	0,29	0,27	0,29	0,12	0,11	0,12
8	0,23	0,21	0,22	0,10	0,09	0,09
9	0,17	0,18	0,19	0,07	0,08	0,08
10	0,19	0,19	0,18	0,08	0,08	0,08
11	0,23	0,21	0,21	0,10	0,09	0,09
12	0,14	0,14	0,14	0,06	0,06	0,06
13	0,20	0,20	0,19	0,09	0,09	0,08
14	0,19	0,16	0,16	0,08	0,07	0,07
15	0,21	0,21	0,20	0,09	0,09	0,09
16	0,21	0,19	0,19	0,09	0,08	0,08
17	0,32	0,32	0,30	0,14	0,14	0,13
18	0,36	0,35	0,32	0,15	0,15	0,14
19	0,37	0,37	0,33	0,16	0,16	0,14
20	0,45	0,42	0,40	0,19	0,17	0,17
21	0,39	0,37	0,36	0,16	0,16	0,15
22	0,43	0,45	0,42	0,18	0,19	0,17
23	0,47	0,47	0,47	0,20	0,20	0,20
24	0,30	0,33	0,32	0,13	0,14	0,14
25	0,29	0,25	0,25	0,12	0,11	0,11
26	0,30	0,27	0,27	0,13	0,11	0,11
27	0,30	0,30	0,25	0,13	0,13	0,11
28	0,39	0,37	0,36	0,16	0,16	0,15
29	0,33	0,32	0,32	0,14	0,14	0,14
30	0,30	0,27	0,27	0,13	0,11	0,11

Man sieht, daß die recht bedeutenden Schwankungen (20 bis 25 Proz. innerhalb 60 Minuten), die *Blix* bei seinen Versuchen fand, in den nephelometrischen Bestimmungen nach unserer Methode nicht vorkommen, und daß die Abweichungen unserer Ablesungen zu den verschiedenen Zeiten die Grenzen unvermeidlicher Ablesungsgenauigkeiten nicht überschreiten.

Was *Blix* meint, wenn er schreibt: „*I have noted, though not closely examined, still more errors inherent in this method*", können wir begreiflicherweise schwerlich wissen, da er nicht näher darauf eingeht.

Wir haben nach unserer Methode annähernd 5000 Blutanalysen unternommen, darunter mehrere Hunderte von doppelten und dreifachen Analysen; nur in *äußerst wenigen* Fällen haben wir größere Differenzen zwischen den einzelnen, einander entsprechenden Analysen gefunden, als diejenigen, welche man in der in unserer ersten Publi-

kation (5) angeführten Tabelle über 12 Doppelanalysen beobachten kann, ein sehr befriedigendes Ergebnis, wenn es sich um derartige klinische Untersuchungen, wie die von uns angestellten handelt; denn die Schwankungen hier sind recht bedeutend. (Selbstverständlich ist einige vorhergehende Übung erforderlich, ohne welche man eine solche Genauigkeit in der nephelometrischen Ablesung nicht erreicht.)

Dabei haben wir einen Mangel entdeckt, welcher leicht zu Fehlschlüssen führen kann, und der nicht nur unserer, sondern allen denjenigen Methoden anhaftet, wo man das Blut einem Schnitt oder Stich in das Ohrläppchen entnimmt. Man läßt hier erst zwei ganze Tropfen abfließen, ehe man das zur Probe bestimmte Blut nimmt, denn diese ersten beiden Tropfen enthalten oft eine größere Extraktmenge (Fett aus dem subkutanen Gewebe?) als das später entleerte Blut. Ferner vermeide man während der Aufsammlung des Blutes einen Druck auf das Ohrläppchen auszuüben, da dies auch leicht eine Steigerung der Extraktmenge zur Folge haben kann.

Schlußfolgerung.

Der primäre Ätherextrakt, nach unserer Methode quantitativ bestimmt, besteht auf Grund der Untersuchungen von *Bang* und *Blix* aus dem im Blute enthaltenen freien Cholesterin und Neutralfett.

Es ist die Summe dieser beiden Substanzen, deren Größe wir in unseren früheren Untersuchungen bestimmt haben, und die bei normalen, nüchternen Individuen innerhalb der Grenzen 0,06 und 0,12 Proz. variiert.

Triolein, Cholesterin — zusammen oder jedes für sich — werden quantitativ nach unserer Methode bestimmt; dasselbe ist mit natürlich vorkommenden Fetten wie Ol. amygdalae und Milchfett der Fall.

Die Aufschlemmungen, welche nephelometrisch nach unserer Methode bestimmt werden, halten sich unverändert während eines Zeitraumes von 15 Minuten bis 2 Stunden nach ihrer Zubereitung; innerhalb dieser Zeit läßt sich also die Bestimmung ausführen, ohne daß man irgendwelche Gefahr läuft, einen systematischen Fehler zu machen.

Bei der Blutprobe vom Ohrläppchen darf man nicht auf jenes drücken und die ersten beiden Tröpfchen nicht zur Probe verwenden.

Literatur.

1) *G. Blix*, A critical study of the nephelometric determination of blood fat. Skand. Arch. f. Phys. **46**, 121, 1924. — 2) *H. E. Gade*, Disputats. Bibl. f. Läger. 1919. — 3) *Bing* und *Heckscher*, Unters. über Lipämie II. diese Zeitschr. **149**, 83, 1924. — 4) *Dieselben*, Unters. über Lipämie III, ebendaselbst **149**, 90, 1924. — 5) *Dieselben*, Unters. über Lipämie I, ebendaselbst **149**, 79, 1924. — 6) *H. Heckscher*, Détermination néphélométrique des émulsions bactériennes, C. r. **85**, 378, 1921.

Der Fett-Cholesteringehalt des Blutes bei Patienten mit morbus Basedowii.

Von

H. J. Bing und H. Heckscher.

(Aus der II. Abteilung des Kommunehospitals und dem Blegdamshospital, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 24. März 1925.)

Mit 7 Abbildungen im Text.

In einer früheren Publikation[1]) haben wir die Beobachtung von verminderten Werten der Ätherextraktmenge des Blutes bei drei Basedowpatienten mitgeteilt. Seit der Veröffentlichung dieser Mitteilung haben wir Gelegenheit gehabt eine größere Reihe solcher Patienten zu untersuchen, und zwar jeden einzelnen durch eine etwas längere Zeit. Es sind die Resultate dieser Untersuchungen, welche wir hier vorlegen.

Der Zweck dieser Arbeit war derjenige zu bestimmen, wie große Mengen von Blutfett-Cholesterin man während der verschiedenen Phasen des Hyperthyreoidismus findet. Die Untersuchungen sind in derselben Weise wie die früher mitgeteilten vorgenommen worden, indem wir unsere Blutproben aus dem Ohrlappen der durch 12 Stunden fastenden Patienten genommen und die Größe *des primären Ätherextrakts* durch die von uns publizierte Methode[2]) bestimmt haben. In einigen Fällen haben wir es versucht, diese Untersuchungen mit Bestimmungen der Extraktmenge nach Eingabe von Fett per os zu vervollständigen. Wie bei ähnlichen, früher mitgeteilten Untersuchungen gaben wir als „Funktionsprobe-Mahlzeit" einen großen Zwieback mit Margarine nebst einer bestimmten Menge Schlagsahne, welche bei diesen neueren Untersuchungen in dem Verhältnis von 1 g Milchfett pro 1 kg Körpergewicht dosiert wurde. Die Resultate werden in dem

[1]) Unters. über Lipämie, III, diese Zeitschr. **149**, 90, 1924.
[2]) Unters. über Lipämie, I, ebendaselbst **149**, 79, 1924.

Folgenden für jeden einzelnen Patienten nebst einem kurzen Resümee seiner respektiven Krankengeschichte und der sonstigen objektiven Funde mitgeteilt.

Hier werden dann zunächst die Resultate der Untersuchungen von 12 Patienten mit Morbus Basedowii angeführt.

Basedowpatientin Nr. 1. E. M. D., q., 26 Jahre (LXXIII). Früher gesund, speziell ohne sichere Symptome von Krankheiten in Gl. thyreoidea. Die Menstruation natürlich. Vom 6. April bis 10. Juni auf dem Blegdamshospital unter der folgenden Diagnose behandelt.: ***Broncho-Pneumonia lob. inf. dext. Mb. cordis mitralis. Dilatatio cordis m. gr.*** War sehr krank, hochfebril während 2 Wochen. Am 26. April, während der Rekonvaleszenz bemerkte man zum erstenmal eine wachsende Struma nebst leichtem Exophthalmus, Tremor linguae und Schweiß. Diese Symptome nahmen nach und nach an Stärke zu, es kam ziemlich kräftiger Tremor manuum, auch die Herzaktion hielt sich stark beschleunigt. Wurde am 10. Juni auf die chirurgische Abt. D. des Rigshospitals gebracht. Hier beobachtete man am 10. Juni: Mandaringroße Struma, den rechten Lappen, Isthmus und ein wenig von dem linken Lappen umfassend, von gleichartiger, ziemlich fester Konsistenz. Ziemlich starken Exophthalmus mit dem Rand des oberen Augenlides 2 mm über Iris. Tremor manuum. Schweiß. Dilatation von Cor nach rechts bis 1 cm außerhalb Medioclaviculaerlinie. Pulsation im Präcordium. Starke psychische Agilität. 23. Juni: Unruhe. Schweiß. Schlechten Appetit. 1. August: Allgemeinzustand besser, ist ruhiger, nimmt jedoch nicht an Gewicht zu. 1. November: Bedeutend besser, nimmt an Gewicht zu. [Fortdauernde Besserung der Basedowsymptome während bettlägerig und reichlicher Ernährung. Am 25. Nobember strumectomiert. Histologische Untersuchung der Struma: ***Struma parenchymatosa*** (***Basedow***)].

Datum	Gewicht kg	Fett-Cholesterin Proz.	Funktionsprobe Proz.
28. IV.	34,2	0,09	
30. IV.	—	0,08	0,08—0,11—0,13—0,11—0,09
5. V.	34,8	0,06	
7. V.	—	0,06	
12. V.	33,9	0,06	
25. V.	35,0	0,06	
14. VI.	33,9	0,07	
18. VI.	32,8	0,08	
22. VI.	—	0,06	
26. VI.	32,0	0,06	
1. VII.	—	0,08	
5. VII.	31,7	0,09	
10. VII.	32,3	0,09	
15. VII.	—	0,12	
24. VII.	—	0,10	
31. VII.	33,4	0,11	
7. VIII.	33,9	0,08	
15. VIII.	34,2	0,08	
30. VIII.	—	0,09	
19. IX.	37,7	—	
17. X.	40,0	—	

Basedowpatientin Nr. 2[1]. *H. A. C. J., q., 43 Jahre* (1381/23). Früher gesund. Die Menstruation natürlich. Die Krankheit begann Juni-Juli 1923 mit Müdigkeit, Herzklopfen, Nervosität und Diarrhoea. Struma 1 bis 3 Monate später bemerkt. Auf das Kommunehospital, Abt. II, am 17. Dezember 1923 eingelegt. Obj.: Eine querlaufende 2 cm breite Struma, diffus, von fester Konsistenz, wenig prominierend. Leichter Exophthalmus. *Stellwags* Symptom vorhanden. Cor natürlich, abgesehen von einem leichten, systolischen Geräusch bei Apex. Röntgenbestrahlung von Struma am 21. und 24. Dezember und am 24. und 26. Januar 1924: im ganzen 6 S-N durch 4 mm Ahl-Filter auf jedem der zwei Felder. 21. Dezember: Ziemlich nervös. Etwas Herzklopfen und Angst. 15. Januar: e. l., wohl. Nimmt an Gewicht zu. 1. Februar: Wird für Landaufenthalt ausgeschrieben.

Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.	Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.
17. XII.	54,6	0,11	9. I.	—	0,08
19. XII.	—	0,05	10. I.	—	0,07
20. XII.	—	0,06	12. I.	—	0,08
21. XII.	—	0,06	14. I.	55,7	0,07
23. XII.	54,5	0,08	21. I.	56,4	0,04
24. XII.	—	0,08	23. I.	—	0,07
27. XII.	—	0,02	24. I.	—	0,06
28. XII.	—	0,08	25. I.	—	0,08
30. XII.	—	0,02	26. I.	—	0,04
31. XII.	55,7	0,02	27. I.	—	0,06
2. I.	—	0,04	28. I.	56,6	0,02
4. I.	—	0,06	29. I.	—	0,02
5. I.	—	0,02	31. I.	—	0,07
7. I.	54,8	0,08	1. II.	—	0,05
8. I.	—	0,08			

Basedowpatientin Nr. 3. M. A., q., 38 Jahre (583/24). 156 cm hoch. Gesund bis zum Anfang der jetzigen Krankheit. Während der letzten 8 Jahre Ren. mobilis dexter. „Immer" ein wenig nervös. Zunehmende Nervosität während der letzten 9 Monate. Sonst keine subjektiven Symptome. Die Menstruation normal. Auf Kommunehospital, Abt. II, vom 17. Mai bis 18. Juli 1924 behandelt. Bei der Hospitalisierung fand man: Kleine, diffuse Struma, deren Seitenlappen, wenn die Patientin aufrecht sitzt, ein wenig vor m. m. Sternocleidomast. prominieren. Sausen in den Halsgefäßen. Leichter Exophthalmus. *Graefes* Symptom zugegen, die anderen Augensymptome dagegen nicht. Schwitzen. Tremor manuum. Psychische Labilität. Motorische Unruhe mit kleinen Zuckungen in den Armen. Lebhafte Sehnenreflexe. Dermographismus. Cor natürlich. Mit Bettlager, kräftiger Nahrung und infus. valerian. brom. behandelt. 26. Mai: *Stoffwechselbestimmung* (*Benedict*): etwa 108 Proz. 19. Juni: Hochgradiges Schwitzen. 26. Juni: Vermehrte Spannung im Halse.

[1]) Siehe auch die Kurve, diese Zeitschr. **149**, 96, 1924.

Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterinmenge Proz.	Funktionsprobe Proz.
19. V.	47,3	0,05	
24. V.	—	0,07	
25. V.	—	0,06	
26. V.	47,3	—	
27. V.	—	0,08	
28. V.	—	0,07	0,07—0,06—0,08—0,07—0,06—0,06
23. VI.	47,7	—	
17. VII.	48,8	—	

Basedowpatient in *Nr. 4. M. C. H., q., 48 Jahre* (682/24). 159 cm hoch. Früher gesund. Die Genitalfunktionen natürlich. Menostase: 47½ Jahr alt. Behandelt auf Kommunehospital, Abt. II, vom 12. Juni bis zum Todestage, dem 25. Juni 1924. Die letzten zwei Jahre Schlaflosigkeit und Nervosität. Basedow 2½ Monat vor der Hospitalisierung diagnostiziert, dann mit Röntgenbestrahlungen behandelt. Die letzten Tage vor der Einlegung Ödem von Füßen und Crura. Große Struma, besonders den rechten Lappen umfassend. Kräftige Gefäßgeräusche. Perifere Veneustase. Kein Schwirren. Die Augen „wild", aber ohne Exophthalmus. *Graefes* Symptom da, die anderen Augensymptome nicht. Cor: Totale Verbreitung von vier Fingerbreiten rechts von Sternum bis drei Fingerbreiten außerhalb Papill. Die Töne rein. Lungen: Ein wenig Crepitation in den beiden regiones infrascapulares. Fibrilläre Zuckungen der Zunge. 16. Juni: Ruhiger, der Puls regelmäßig. 18. Juni: Unruhiger, übermäßig gewaltige Herzaktion. 20. Juni: Unruhig, weinend, in der Nacht im Zimmer auf und ab gehend. 24. Juni: Unruhig, verwirrt, kleiner Puls. 25. Juni: Unklar, umnebelt, unruhig, wühlend, spricht unartikuliert. *Mors.* Sektionsdiagnose: Morbus Basedowii. — Degeneratio, steatosis cordis, hypertrofia cordis — Cirrhosis cardialis hepatis — Stasis renis et lienis.

Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterinmenge Proz.	Funktionsprobe Proz.
13. VI.	—	0,07	
14. VI.	—	0,08	
16. VI.	54,8	0,07	
18. VI.	—	0,09	
19. VI.	—	0,06	
23. VI.	51,2	0,05	0,08—0,08—0,10—0,06—0,05—0,06

Basedowpatient in *Nr. 5. A. S. M., q., 60 Jahre* (754/24). Febr. rheum. im Alter von 44 Jahren, sonst immer gesund. Die Genitalfunktionen normal. Menostase 42 Jahre alt. Auf Kommunehospital, Abt. II, vom 28. Juni bis zum 25. Juli 1924 behandelt. Die letzten 6 Monate Müdigkeit, Nervosität, Schlaflosigkeit, Herzklopfen, Schwitzen, Gewichtsverlust. Moderate Struma, Isthmus jedoch bedeutend geschwollen. Kräftige Pulsation am Halse. Moderater Exophthalmus. *Graefes* und *Stellwags* Symptome da. Schwitzen. Tremor manuum. Blutdruck: 165/75. Blutzucker: 0,076 Proz. Faustgroße Fibroma uteri. 15. Juli: Schwitzt weniger, der Puls stets sehr frequent.

Datum	Gewicht kg	Blutfettmenge Proz.	Datum	Gewicht kg	Blutfettmenge Proz.
2. VII.	—	0,06	10. VII.	—	0,07
3. VII.	—	0,06	11. VII.	—	0,06
5. VII.	61,5	0,05	20. VII.	61,7	—
8. VII.	—	0,07			

Basedowpatient in *Nr. 12. D. M. S., q., 55 Jahre* (LXXX). Gesund bis zum Eintritt der Menostase vor 4 Jahren; seitdem müde und nervös. Seit 1 Jahre Struma, Exophthalmus und Schlaflosigkeit. Keine Diarrhoea. Auf der chirurgischen Abteilung D. des Rigshospital vom 11. Mai bis zum 14. Juni 1924 behandelt. 11. Mai: Struma, klein, diffus, weich, elastisch, mit Pulsation und Schwirren. Starker Exophthalmus, besonders des rechten Auges. *Graefes* Symptome da, die anderen Augensymptome dagegen nicht. Mäßiges Schwitzen. Cor etwas dilatiert mit verbreitetem Ictus und leicht unregelmäßiger Aktion. 16. Mai: Motorische Unruhe. 6. Juni: Tumultuarische Herzaktion mit zahlreichen Extrasystolen. 14. Juni: Auf die medizinische Abteilung B hinübergebracht. 23. Juni: *Mors.*

Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterinmenge Proz.	Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterinmenge Proz.
12. V.	54,6	—	31. V.	—	0,05
23. V.	55,4	—	6. VI.	—	0,06
25. V.	—	0,06	7. VI.	56,0	—
30. V.	56,4	—	10. VI.	—	0,06

Basedowpatientin Nr. 6. E. S., q., 26 Jahre (430/24). Größe 160 cm. Früher gesund. Auf Kommunehospital, Abt. II, vom 11. April bis zum 15. Mai 1924 behandelt. Struma vor 6 Monaten beobachtet, wegen

Datum	Gewicht kg	Blutfettmenge Proz.	Funktionsprobe, Blutfettmenge Proz.
12. IV.	55,3	—	
15. IV.	—	0,06	
19. IV.	—	0,06	0,06—0,06—0,08—0,06—0,05—0,04
21. IV.	53,5	—	
23. IV.	52,4	0,05	
24. IV.	—	0,06	
28. IV.	52,1	—	
29. IV.	—	0,09	
1. V.	—	0,06	
2. V.	—	0,07	
5. V.	52,7	—	
6. V.	—	0,08	
7. V.	—	0,08	
8. V.	—	0,07	
9. V.	—	0,08	
11. V.	—	0,08	
12. V.	53,5	—	
13. V.	—	0,11	
14. V.	—	0,10	
15. V.	—	0,10	

Schmerzen in der rechten Seite des Halses entdeckt. Der Allgemeinzustand ganz gut, indem die Patientin ihre Arbeit als Näherin bis zur Hospitalisierung ausführen konnte. Moderate Struma von gleichartiger, weicher Konsistenz, beide Seitenlappen einnehmend. Kein Exophthalmus, auch keine anderen Augensymptome. Dagegen Schwitzen und Tremor manuum. Cor: Normal, abgesehen von systolischem Geräusche über allen Ostien. Hämoglobin (*Sahli*): 93. Stoffwechselbestimmung (*Benedict*): Am 28. April und am 5. Mai etwa 112 und etwa 115 Proz. Röntgenbehandlung den 8. und 12. Mai: Zwei Felder, jedes 1 S-N durch 4 mm Ahl-Filter. 14. April: Schwitzt etwas, sonst wohl. 22. April: Verliert an Gewicht, das Befinden sonst gut. 15. Mai: Befindet sich im ganzen besser. Noch ein wenig Tremor. Die Struma nicht verändert. Fortgesetzte Röntgenbehandlung ambulant.

Basedowpatient in Nr. 7. B. M. C., q., 38 Jahre (LXII). Früher gesund. Die Genitalfunktionen normal. Auf dem Rigshospital, Abt. D., vom 24. März bis zum 24. Mai 1924 behandelt. Während des letzten halben Jahres Struma und Herzklopfen. Diffuse Struma. Halsumfang: 34 cm. Handgelenkumfang: 15 ½ cm. Schwirren von Struma. Exophthalmus und *Graefes* Symptom zugegen, die anderen Augensymptome nicht. Cor: Systolisches Geräusch, P_{II} größer als A_{II}, sonst normal. 25. April: Unter Lokalanästhesie *Strumectomie* mit Entfernung des ganzen rechten Lappens, des Isthmus und eines Keils vom vorderen Teile des linken Lappens. 27. April: Befindet sich relativ wohl, ohne Unruhe, ohne Schweiß, nur mit geringem Herzklopfen und unbedeutendem Tremor. 15. Mai: Wohlbefinden wenn e. l. 22. Mai: Befindet sich wohl; geht gut herum, gerät jedoch leicht in Schweiß, ißt mit gutem Appetit und nimmt an Gewicht zu. Tremor. 24. Mai: Ausgeschrieben in einem nach der Operation entschieden besseren Zustande. 26. Juni: Bedeutende Geschwulst des restierenden Teiles des linken Lappens. Der Zustand nicht gut, weil Tachycardie, Tremor, Schwitzen und psychische Unruhe. Mikroskopie von Struma: *Struma parenchymatosa proliferativa* (*Basedow*).

Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.	Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.
25. III.	51,7	—	21. IV.	—	0,04
26. III.	—	0,07	26. IV.	—	0,07
28. III.	—	0,07	28. IV.	—	0,07
31. III.	—	0,06	30. IV.	—	0,07
3. IV.	53,4	0,07	5. V.	—	0,09
5. IV.	—	0,08	11. V.	—	0,14!
8. IV.	—	0,09	15. V.	—	0,13!
11. IV.	53,6	—	20. V.	—	0,13!
13. IV.	—	0,08	21. V.	54,6	—
17. IV.	—	0,05	22. V.	—	0,15!
19. IV.	55,5	—	26. VI.	—	0,07

Basedowpatient in Nr. 8. H. V. P. H., q., 47 Jahre (LXXXVI). Auf dem Rigshospital, Abt. D., vom 4. Juli bis zum 11. August behandelt. Früher gesund. Die Genitalfunktionen normal. Menostase im Alter von 45 Jahren. Struma die letzten 4 Jahre vor der Hospitalisierung. Vor 2 Jahren wegen „Colitis" im Hospital behandelt. Seit 6 Monaten Müdigkeit, Herzklopfen, Schwitzen, Tremor und Abmagerung. Die ganze Gl.

thyreoidea diffus vergrößert; Struma jedoch im geringeren Grade den linken Lappen als den rechten Lappen und Isthmus umfasend. Schwirren der Glandula und Sausen in den Halsgefäßen. Halsumfang: 35 cm. Handgelenkumfang: 16 cm. Kein Exophthalmus, keine anderen Augensymptome. Cor: Überall weiches, systolisches Geräusch, sonst natürlich. In den Lungen Ronchi und Rasseln (Bronchitis). 8. Juli: Unruhe, Schweiß, Husten. 14. Juli: Müde, nervös. 16. Juli: Während Lokalanästhesie wird *Strumectomie* gemacht, wodurch der ganze rechte Lappen, Isthmus und der größte Teil des linken Lappens entfernt werden. 17. Juli: Schlapp, schneller Puls, Unruhe. 19. Juli: Schwitzend, geschwächt. 23. Juli: Besser. 11. August: Noch sehr müde, jedoch weniger schwitzend und weniger unruhig. Für Landaufenthalt ausgeschrieben. 26. September: Noch etwas Nervosität und ab und zu ein wenig Tremor manuum nebst Herzklopfen, sonst gesund. Objektiv gesehen, ist sie weit besser als bei der Ausschreibung, aber kaum völlig genesen. Histologische Untersuchung: *Struma parenchymatosa proliferativa* (*Basedow*).

Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterinmenge Proz.	Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterinmenge Proz.
4. VII.	53,8	—	24. VII.	—	0,10
5. VII.	—	0,06	31. VII.	—	0,12
10. VII.	—	0,08	6. VIII.	50,9	—
11. VII.	54,3	—	7. VIII.	—	0,18!
19. VII.	—	0,08			

Basedowpatient in *Nr. 9. A. J. M. L., q., 36 Jahre* (LXXXIII). Auf der Abt. D. des Rigshospitals vom 25. Juni bis zum 13. Juli 1924 behandelt. Gesund bis zum Anfang der jetzigen Krankheit, etwa 1 Jahr vor der Hospitalisierung. Die Genitalfunktionen normal. Begann zu dem angegebenen Zeitpunkt an Herzklopfen, Müdigkeit, Schwitzen und Schütteln der Hände zu leiden, bekam Exophthalmus und verlor an Gewicht. Auf der medizinischen Abteilung B des Rigshospitals vom 19. Februar bis zum 15. April 1924 behandelt. Vor dieser Zeit in den Monaten August—Dezember drei Seancen mit jeder dreimal Röntgenbestrahlung von Struma. Keine wesentliche Besserung des Zustandes nach dieser medizinischen Behandlung. Auf der medizinischen Abteilung während des Aufenthalts dort untersucht, zeigte sich der Stoffwechsel (*Benedict*) als 160 bis 180 Proz. 25. Juni: Ziemlich große, diffuse Struma. Sausen in den Halsgefäßen. Halsumfang: 36 cm. Handgelenkumfang: 15 ½ cm. Exophthalmus vorhanden, aber keine anderen Augensymptome, dagegen Schwitzen und Herzklopfen. Cor: Systolisches Blasen, sonst normal. 28. Juni: Unter Lokalanästhesie *Strumectomie* mit Entfernung beinahe des ganzen rechten Lappens samt des Isthmus und eines bedeutenden Teiles des rechten Lappens. 30. Juni: Etwas Herzklopfen und Gefühl der Hitze, aber ruhig und vernünftig. 1. Juli: Nur geringes Herzklopfen, relatives Wohlbefinden. 7. Juli: Ein wenig Husten. Schwitzt noch immer etwas, hat aber weniger Herzklopfen; Wohlbefinden, wenn e. l. 13. Juli: Kein Herzklopfen, aber etwas Schweiß. Exophthalmus unverändert. Befindet sich gut. Ausgeschrieben. Histologische Untersuchung: *Struma parenchymatosa proliferativa* (*Basedow*).

Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.	Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.
21. VI.	55,5	—	10. VII.	—	0,11
22. VI.	—	0,07	11. VII.	56,3	—
26. VI.	55,3	0,07	13. VII.	—	0,10
28. VI.	—	0,05	17. VII.	—	0,13!
1. VII.	—	0,08	24. VII.	—	0,13!
5. VII.	—	0,08	31. VII.	—	0,11

Basedowpatient Nr. 10. O. B., m., 30 Jahre (LXXIX). Auf der chirurgischen Abt. D des Rigshospitals vom 14. Mai bis zum 2. Juli behandelt. Abgesehen von zweimal Febr. rheum. im frühen Kindesalter keine Krankheit bis zum Anfang der jetzigen. Anschließend an eine Angina begann der Patient im Januar 1919 an Herzklopfen, Schwitzen, Tremor manuum, Diarrhoea und psychischer Unruhe zu leiden. Wurde in drei Perioden auf der medizinischen Abt. B des Rigshospitals behandelt: 8. Juli bis 29. September und 5. bis 10. Dezember 1923 samt 28. April bis 14. Mai 1924. Auf der medizinischen Abteilung wurde Achylia gastrica festgestellt. Der Stoffwechsel (*Benedict*) zeigte Werte zwischen 140 und 160 Proz. Er wurde dort mit Röntgenbestrahlung während zwei Seancen von je drei Bestrahlungen behandelt. 14. Mai: Recht bedeutender Exophthalmus. *Graefes* Symptom da, die anderen Augensymptome dagegen nicht. Man findet Tremor manuum et lingvae, recht große, diffuse Struma von gleichartiger, ziemlich weicher Konsistenz. Leichtes Sausen in den Halsgefäßen, kein Schwirren der Glandula. Halsumfang: 38 cm. Handgelenkumfang: 18½ cm. Cor: Die Grenzen natürlich. Bei Apex schwache Ausziehung von T_I, P_{II} akzentuiert. Starker Ictus, Pulsation im Präcordium. Starker Schweiß. Diarrhoea. 29. Mai: Ruhiger. 18. Juni: Unter Lokalanästhesie *Strumectomie* mit Entfernung von beinahe dem ganzen rechten Lappen, Isthmus und einem großen Stück des linken Lappens. 30. Juni: Wohlbefindend, munter, gut aussehend. 26. Juni: Befindet sich wohl auf, weniger Herzklopfen. 2. Juli: Hat sich erstaunlich erholt. Auch Exophthalmus ist beim Schwinden. Kein Herzklopfen oder Unruhe. Wird ausgeschrieben. Histologische Untersuchung. *Struma parenchymatosa proliferativa* (*Basedow*).

Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.	Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.
15. V.	67,1	—	14. VI.	—	0,08
22. V.	65,5	0,04	17. VI.	—	0,09
25. V.	—	0,05	19. VI.	—	0,06
28. V.	67,3	—	22. VI.	—	0,05
31. V.	—	0,05	26. VI.	72,5	0,10
4. VI.	68,3	—	28. VI.	—	0,07
6. VI.	—	0,05	1. VII.	—	0,10
10. VI.	—	0,07	2. VII.	74,3	—
11. VI.	70,1	—			

Basedowpatientin Nr. 11. A. B. S., q., 21 Jahre (LXI). Auf der chirurgischen Abt. D des Rigshospitals vom 3. November 1923 bis zum 24. Mai 1924 behandelt. Gesund bis vor 2 Jahren, als sie an Nervosität zu leiden begann. Ein halbes Jahr vor der Hospitalisierung bemerkte man zum

erstenmal, daß eine Struma entstanden war. Dieselbe wuchs kräftig, trotz drei Röntgenbestrahlungen. 3. November 1923: Große und prominierende Struma, gleichartig und weich, mit Sausen und Pulsation. Halsumfang: 35 cm. Handgelenkumfang: 15 cm. Bedeutender Exophthalmus samt *Möbius* Symptom vorhanden, die anderen Augensymptome dagegen nicht. Herzklopfen, Tremor manuum, Schweiß. Ab und zu Diarrhoea. Abmagerung. Die Menstruation natürlich. Cor: Geringe Dilatation mit Ictus gerade außerhalb der Papill. Systolisches Blasen über allen Ostien. Pulsation im Präcordium. Kräftiger Dermographismus. 6. und 7. November: Stoffwechsel (*Benedict*): etwa 140 Proz. 8. November: Unruhig, schwitzend. Congestionen an den Kopf. 16. Dezember: Stets unruhig. 23. Januar 1924: Ruhiger, schwitzt aber noch immer heftig. 29. Februar: Ictus ausgedehnt, außerhalb der Medioclavicullaer. 3. März: Stets starkes Schwitzen. Unter Lokalanästhesie *Strumectomie* mit Entfernung des ganzen rechten Lappens, des Isthmus und eines sehr bedeutenden Teiles von dem linken Lappen. 10. April: Sehr viel Unruhe, Schweiß, unerträglicher Durst. 14. April: Weit ruhiger, beinahe nicht schwitzend. 24. Mai: Das Befinden etwas besser, jedoch noch immer etwas Herzklopfen und ein wenig Schweiß. 18. Juni: Noch immer ziemlich unruhig und nervös. Die Herzaktion stark beschleunigt, selbst nach ganz ruhigem Gehen kräftig schwitzend. Tremor manuum. Exophthalmus anscheinend unverändert. Histologische Untersuchung: *Struma parenchymatosa proliferativa* (*Basedow*).

Datum	Gewicht Proz.	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.	Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.
5. XI.	51,5	—	17. IV.	—	0,05
21. XII.	50,8	—	21. IV.	—	0,08
25. I.	55,5	—	26. IV.	—	0,07
7. III.	57,9	—	28. IV.	—	0,05
21. III.	58,6	—	30. IV.	—	0,07
28. III.	58,6	0,06	11. V.	—	0,09
31. III.	—	0,07	20. V.	57,4	0,11
3. IV.	58,6	0,09	22. V.	—	0,05
5. IV.	—	0,09	4. VI.	—	0,08
8. IV.	—	0,09	10. VI.	—	0,06
13. IV.	—	0,07	18. VI.	—	0,09

Als Supplement oder gewissermaßen als Kontrast dieser durch die Untersuchung von Basedowpatienten erreichten Resultate wollen wir demnächst anführen, was wir bei der Untersuchung zweier Patienten mit Struma, welche nach der gewöhnlichen klinischen Untersuchung nicht als Basedow-Struma bezeichnet werden kann, gefunden haben.

Strumapatient in *Nr. 1. S. A. G., q., 41 Jahre* (LXXXVIII). Auf der chirurgischen Abt. D des Rigshospitals vom 12. Juli bis zum 2. August 1924 behandelt. Früher gesund. 15 Jahre hindurch Struma beinahe unverändert an Größe bis auf die letzten Monate vor der Hospitalisierung, während welcher Zeit dieselbe sehr zunahm. Während der letzten Jahre oft Kopfschmerzen und Nervosität nebst etwas Müdigkeit und Herzklopfen. Keine deutlichen Basedowsymptome. Die Genitalfunktionen immer normal. 12. Juli: Mächtig große, feste, knorrige Struma, welche den Hals stark

deformiert, ihn kegelförmig mit Basis des Kegels nach unten bildet. Auch objektiv kein Symptom des Morbus Basedowii. 25. Juli bis 2. August: Sieben Röntgenbestrahlungen. 28. August: Struma ist eher größer. Diagnose: *Struma maligna.*

Datum	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.	Datum	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.
13. VII.	**0,06**	24. VII.	0,10
15. VII.	0,09	31. VII.	0,09
17. VII	0,10	15. VIII.	0,10

Strumapatient in *Nr. 2. A. J. S. N., q., 46 Jahre* (LXXXV). Auf der chirurgischen Abt. D des Rigshospitals vom 4. Juli bis zum 23. August 1924 behandelt. Früher gesund, Die Genitalfunktionen immer normal. Menostase im Mai 1924. Seit 8 Jahren Struma, die letzten 6 Monate an Größe zunehmend. Während des Zeitraums Januar—Mai 1924 mit fünfmaliger Röntgenbestrahlung behandelt. Struma nahm ein wenig ab während dieser Behandlung, die Patientin wurde aber müde und litt an Herzklopfen. Ohnmachten und vielleicht ein wenig Gewichtsverlust. 4. Juli: Nußgroße, glatte, wohlabgegrenzte Schwulst von dem rechten Lappen der Gl. thyreoidea und Isthmus. Keine vaskulären Phänomene. Halsumfang: 35 cm. Handgelenkumfang: 15 ½ cm. Kein Exophthalmus, keins der sonstigen Augensymptome bei morbus Basedowii. Etwas Tremor manuum et linguae. 17. Juli: Unter Lokalanästhesie *Strumectomie* mit Entfernung von beinahe dem ganzen rechten Lappen, Isthmus nebst einem Teil des rechten Lappens. 22. Juli: Matt, ohne Schwitzen oder Unruhe. 9. August: Wohlbefindend, e. l. 23. August: Sieht wohl aus, befindet sich gut. Histologische Untersuchung: *Strumacolloid, strumitis mit Bindegewebe- und Rundzelleninfiltration*

Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.	Datum	Gewicht kg	Blutfett-Cholesterin-menge Proz.
5. VII.	—	0,12	24. VII.	—	0,09
7. VII.	49,0	—	31. VII.	—	0,12
10. VII.	—	0,08	7. VIII.	—	**0,18!**
11. VII.	50,6	—	15. VIII.	49,1	0,08
15. VII.	—	0,12	22. VIII.	49,6	0,09
17. VII.	—	**0,18!**			

Das Hauptresultat dieser Untersuchungen ergibt sich gleich für denjenigen, der die obenstehenden Tabellen und die Kurven, welche als Beispiele dieselben illustrieren, betrachtet, wohl zu verstehen, wenn er die Werte, die während der ersten Zeit des Hospitalaufenthalts der Patienten gefunden wurden, betrachtet. Diese Werte sind beinahe alle gering; in einigen Fällen liegen sie unterhalb der unteren Grenze der normalen Extraktmenge, welche, nach unseren früher mitgeteilten Untersuchungen[1]) bei dem Werte von 0,06 Proz. gesetzt werden muß. In den meisten anderen Fällen liegen die Werte dicht oberhalb dieser Grenze. Die niedrigste der gefundenen Blutfett-Cholesterinmengen ist 0,02 Proz.; die Extraktmenge war jedoch

[1]) Unters. über Lipämie, III, l. c.

nur bei einer einzigen Patientin (Nr. 2) so niedrig; bei den anderen wurden nur ausnahmsweise Werte unter 0,05 Proz. gefunden. Wenn man diese Werte mit denen, die man bei normalen Menschen findet, vergleicht, zeigt sich deutlich der Unterschied; die des primären Ätherextrakts bei den Basedowpatienten ist niedriger als diejenige, welche man in der Regel bei normalen, erwachsenen Menschen findet[1]). Bei den beiden Strumapatienten fand man dagegen normale und leicht erhöhte Werte.

Bei einzelnen der Untersuchungen wurden jedoch auch bei den Basedowpatienten Werte weiter hinauf innerhalb der Grenzen des Normalen (0,06 bis 0,12 Proz.) gefunden; solche Werte finden sich in mehreren der Tabellen, wo sie die Reihe der niedrigen Werte unterbrechen. Was die Ursache dieser Schwingungen ist, kann noch nicht mit Sicherheit festgestellt werden; es gibt verschiedene Faktoren, welche man sich hierbei tätig denken könnte. Man muß in dieser Verbindung gewiß zunächst an die Drüsenfunktion selbst, die interne Sekretion der Glandula thyreoidea denken. Nach allem, was man über die schnellen Veränderungen im Befinden und in Symptomen der Patienten weiß, könnte die Annahme billig scheinen, daß diese Drüsenfunktion an Grad, wie vielleicht auch an Art, von Tag zu Tag variieren könne. Ferner ist es wohl wahrscheinlich, daß auch an sich Verhältnisse wie der Wasserinhalt des Körpers und der momentane Zustand des Herzens Einfluß ausüben; wir haben früher[2]) einige Beobachtungen von variierender Ätherextraktmenge bei Patienten mit Morbus cordis mitgeteilt, bei welchen die Werte bei einer vorübergehenden Inkompensation mit Ödemen höher waren als später, wenn sich die Inkompensation gelegt hatte und die Ödeme schwanden. Wahrscheinlich besteht ein Zusammenspiel zwischen diesen und eventuell verschiedenen anderen Faktoren, welches für die Größe der Blutfett-Cholesterinmenge, die man in jedem gegebenen Augenblick findet, bedingend ist. Diese Schwingungen sind aber, alles in allem, jedoch nur Ausnahmen von der Regel, daß die Werte bei Patienten mit Morbus Basedowii niedrig sind.

Bei den Patienten (Nr. 2, 3, 4 und 5), welche nur während der Zeit, wo die Basedowsymptome vorherrschend waren, untersucht wurden, fanden sich nur niedrige Werte, mit einzelnen Ausnahmen 0,07 Proz. oder darunter. Was die anderen Patienten betrifft, so stiegen dagegen die Werte gegen den Schluß der Observationszeit. Betrachtet man unter diesen zuerst diejenigen, welche chirurgisch mit *Strumectomie* (Nr. 7, 8, 9, 10 und 11) behandelt wurden, sieht man, daß die Extraktmenge nach der Operation steigt; man findet einige Zeit nach der Operation nicht mehr die niedrigen

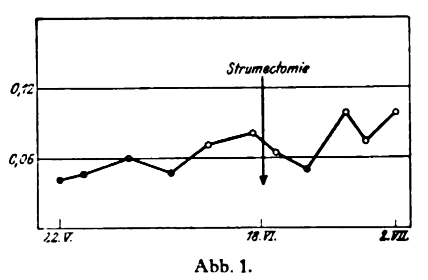


Abb. 1.

und für Morbus Basedowii charakteristischen Zahlen, sondern Werte, die deutlich höher liegen, ja in einigen Fällen so hoch, daß man von reellen Vergrößerungen reden muß. Am wenigsten deutlich kommt dies bei den beiden letzten Patienten (Nr. 10 und 11) zum Vorschein. Bei Nr. 10 (Abb. 1) findet man schon bei den beiden, unmittelbar vor der Operation

---

[1]) Unters. über Lipämie, II, diese Zeitschr. **149**, 83. 1924.

[2]) Unters. über Lipämie, III, l. c.

unternommenen Bestimmungen eine gemäßigte Steigerung der Blutfett-Cholesterinmenge bis 0,08 und 0,09 Proz.; dies läßt sich vielleicht dadurch erklären, daß sich die Krankheit gerade zu diesem Zeitpunkt zu bessern schien; der Patient war ruhiger als früher geworden, und das Gewicht war zunehmend. Nach der Operation, in den ersten Tagen nach derselben, finden wir wieder niedrigere Werte, wahrscheinlich unter dem Einfluß der Operation selbst. Danach steigen die Werte wieder, diese Steigung ist aber nicht so kräftig wie diejenige, welche wir bei den Patienten Nr. 7, 8 und 9 finden. Möglicherweise kann dies dadurch erklärt werden, daß der Patient, der sich besonders wohl befand, schon am 14. Tage nach der Operation ausgeschrieben zu werden verlangte; denn teils weiß man, daß die Wirkung des Thyreoidins, welches den Patienten eingegeben wird, mehr als 14 Tage über das Aufhören der Dosierung hinaus fortdauern kann, teils sehen wir bei den drei erwähnten Patienten, daß die höchsten Werte noch 14 Tage nach der Strumectomie nicht erreicht sind.

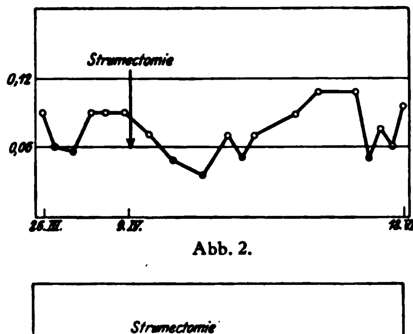


Abb. 2.

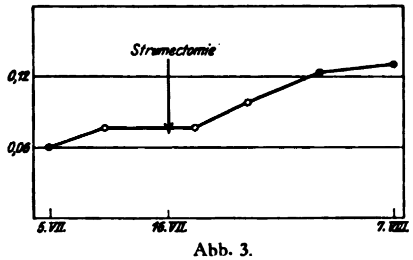


Abb. 3.

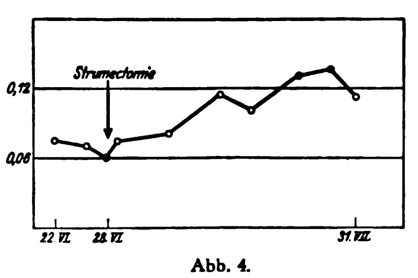


Abb. 4.

Ganz andere Verhältnisse finden wir bei der Patientin Nr. 11 (Abb. 2); hier ist der Zustand sowohl vor als nach der Operation weit weniger klar als bei den anderen. Man sieht an der Tabelle über ihr Gewicht, daß dasselbe nach einer ziemlich bedeutenden Steigung (von 51,5 bis 58,6 kg), welche auf die ersten Monate des Hospitalaufenthalts fällt, sich eine Zeitlang konstant auf 58,6 kg hält, ein Gewicht, das im Verhältnis zu ihrer Größe jedoch einigermaßen befriedigend ist. Dennoch zeigt die Patientin beständig Unruhe, Schwitzen und Tachycardie, nebst unverändertem Exophthalmus. Bei dieser Patientin findet man sowohl vor als nach der Strumectomie ziemlich springende Werte, zwischen 0,03 und 0,11 wechselnd, und zwar abwechselnd abnorm niedrig und normal. Leider liegen keine Bestimmungen über den Stoffwechsel der Patientin in dem Zeitraume vor, währenddessen diese Untersuchungen vorgenommen wurden; vielleicht hätte man dadurch Anhaltspunkte für eine sicherere Schätzung ihres Zustandes zu den verschiedenen Zeitpunkten bekommen. Wie dem nun ist, läßt es sich nicht mit Sicherheit sagen, daß unsere Untersuchungen hier anderes auszeigen, als daß man zeitweise Verminderung der Fett-Chlolesterinmenge im Blute gefunden hat.

Die drei übrigen strumectomierten Patienten Nr. 7, 8 und 9 zeigen gleichartige Verhältnisse (Abb. 3 und 4): Vor der Operation Basedow-

symptome und niedrige Fett-Cholesterinmenge, nach der Operation schwindende Symptome, besseren Allgemeinzustand und stark steigenden Wert. Die Anzahl der Tage zwischen der Strumectomie und dem Erscheinen dieser vergrößerten Werte war bzw. 16, 21 und 19. Besonderes Interesse knüpft sich an die Untersuchung des Patienten Nr. 7 (Abb. 5). Hier fand man 16 Tage nach der Operation eine Extraktmenge von 0,14 Proz., und diese Erhöhung hielt sich fortdauernd, jedenfalls bis 27 Tage nach der Operation, wo man den Wert 0,15 Proz. fand. 2 Monate nach der Operation war indessen eine bedeutende Geschwulst an dem restlichen Teil des linken Lappens von Glandula thyreoidea entstanden, und es war Rezidiv von den Basedowsymptomen; zu dieser Zeit fand man wieder eine niedrige Extraktmenge: 0,07 Proz.

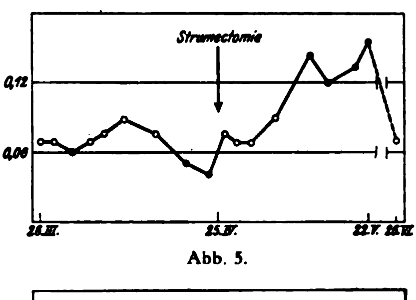


Abb. 5.

Noch müssen wir die Patienten Nr. 1 und 6 betrachten. Bei der Patientin Nr. 1 (Abb. 6) entwickelte sich die Basedowkrankheit erst während des Hospitalaufenthalts selbst, im Anschluß an eine äußerst ernsthafte Influenza-Pneumonia, und hatte eine fernere Abmagerung der im voraus nicht besonders wohlgenährten Patientin zur Folge. Die ersten Blutproben, welche gleich in den Tagen nach der ersten Wahrnahme der Basedowsymptome genommen wurden, zeigten sinkende Fett-Cholesterinmenge bis zum Minimum: 0,06 Proz. 2 Monate später begannen die Werte wieder zu steigen, und noch einen Monat später konnte man eine Besserung des Allgemeinzustandes der Patientin nebst Gewichtszunahme bemerken, welche letztere im Laufe von 1 ½ Monaten etwa 13 Proz. ihres Gewichts (von 33,4 auf 37,7 kg) betrug.

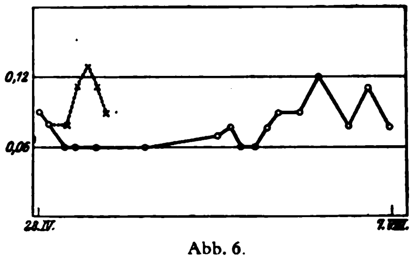


Abb. 6.

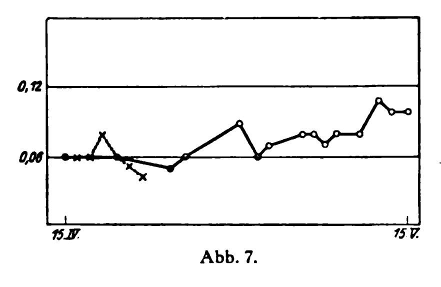


Abb. 7.

Auch bei der Patientin Nr. 6 (Abb. 7) zeigte sich gegen den Schluß des Hospitalaufenthalts eine Besserung des Zustandes; dementsprechend wurden höhere Blutfettwerte gefunden.

Von „Funktionsproben“, Bestimmungen der Größe der alimentären Steigerungen der Extraktmenge des Blutes haben wir vier ausgeführt, bei den Patienten Nr. 1, 3, 4 und 6. Der Versuch mit der Patientin Nr. 1 ist gleich am Anfang ihrer Krankheit, ehe das Sinken der fastenden Werte noch zu Ende gegangen war, ausgeführt worden. Der Anfangswert (fastend) war hier 0,08 Proz., also nicht besonders niedrig, und die Größe des Ausschlags, sowohl an Höhe als an Dauer, unterscheidet sich nicht von dem Normalen. Vergleicht man indessen die Verhältnisse

bei den drei anderen Patienten mit den früheren[1]), bei normalen Menschen beobachteten Verhältnissen, wird man *in der Dauer der alimentären Steigung* einen Unterschied erblicken, bei den drei Basedowpatienten ist diese Steigung schon nach Verlauf von 3 bis 4 Stunden vorbei, während sie bei Normalen als Regel bis nach der fünften Stunde dauert. Diese Untersuchungen sind jedoch so wenig an Zahl, daß sie im höchsten Grade der Ergänzung bedürfen.

Aus den obigen Mitteilungen ergibt sich ja, daß diese Resultate unserer Untersuchungen von Basedowpatienten nicht überall ganz eindeutig sind. Dennoch meinen wir, daß man aus dem vorliegenden folgende Schlüsse ziehen darf:

1. Bei Patienten mit Morbus Basedowii ist die Blutfett-Cholesterinmenge, die Größe des primären Ätherextrakts, als Regel gering, nahe der unteren Grenze des Normalen (0,06 Proz.); nicht ganz selten findet man noch Werte unter 0,06 Proz.

2. Die alimentären Steigungen, welche nach Eingabe von 1 g Milchfett (in Form von Schlagsahne) pro 1 kg Körpergewicht entstehen, scheinen von kürzerer Dauer als bei normalen Menschen zu sein.

3. Ein Rückgang der Basedowsymptome, sei es während medizinischer Behandlung (eventuell mit Röntgenbestrahlung kombiniert), oder nach Strumectomie, wird von einer Steigung im Fett-Cholesterininhalt des Blutes begleitet, und zwar kann dieser nach Strumectomie sogar größer als normal, größer als 0,12 Proz. werden.

---

[1]) Unters. über Lipämie, II, l. c.

Untersuchungen über den Fett-Cholesterin-Gehalt des Blutes bei thyreoidectomierten Pferden.

Von

H. Heckscher.

(Mitteilung aus dem Blegdamshospital, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 24. März 1925.)

Mit der Mitteilung von Untersuchungen über die „Fett-Cholesterinmenge des Blutes bei Patienten mit Morbus Basedowii"[1]) haben *Bing* und *Heckscher* nachgewiesen, daß Strumectomie bei solchen Patienten ein Ansteigen der Blutfett-Cholesterinmenge hervorrufen kann. Die Ätherextraktmenge, die vor der Operation sehr niedrig befunden wurde, in einigen Fällen sogar niedriger als normal, stieg nach der Strumectomie, während gleichzeitig eine Besserung im ganzen Zustand der Patienten erschien, bedeutend, bei mehreren Patienten bis zu Werten größer als normal.

Diese Beobachtung konnte jedoch von vornherein über die Verhältnisse nichts Sicheres aussagen, wo wir es mit einer normalen Drüsenfunktion zu tun haben; man könnte sich sehr wohl denken, daß die nachgewiesene Verbindung zwischen der Glandula thyreoidea und dem Fettinhalt des Blutes bei Morbus Basedowii eben durch das Krankhafte der Drüsenfunktion bedingt wäre. Es ist deshalb von Interesse, denselben Versuch mit normalen Individuen zu machen, die Verhältnisse vor und nach der Thyreoidectomie an solchen zu untersuchen. Da dieser Versuch selbstverständlich nicht an Menschen ausgeführt werden kann, habe ich meine Zuflucht zu Versuchen mit Pferden genommen. Leider ist es mir aus praktischen Gründen unausführbar gewesen, dieselben Pferde sowohl bei normalem als bei thyreoidectomiertem Zustand zu untersuchen; ich habe mich mit vergleichenden Untersuchungen von normalen und thyreoidectomierten Tieren begnügen müssen. Beide Kategorien habe ich in dem „*Statens Seruminstitut*" gefunden, dessen Direktor, Herrn Dr. med. *Th. Madsen*, und Stall-

[1]) Diese Zeitschr. **158**, 403, 1925.

meister, Herrn *Möller*, ich hierdurch meinen besten Dank für ihre Hilfe bei Ausführung der Versuche ausspreche.

Der erste Versuch bestand aus einer Untersuchung des Fett-Cholesterininhalts in dem Totalblut und in dem Serum bei zwei normalen und sechs thyreoidectomierten Pferden. Die Resultate ergeben sich aus der Tabelle I (alle Analysen wurden a. m. *Bing* und *Heckscher* ausgeführt).

Tabelle I.

	Fett-Cholesterinmenge, Proz.			
	Citratblut	Serum	Citratblut ÷ Serum (durch Subtraktion)	
Normale Pferde				
Nr. 469	0,03	0,01	0,02	0,025
„ 472	0,03	0,00	0,03	
Thyreoidect. Pferde				
Nr. 315	0,05	0,02	0,03	0,023
„ 338	0,05	0,03	0,02	
„ 417	0,07	0,05	0,02	
„ 442	0,06	0,03	0,03	
„ 467	0,05	0,04	0,01	
„ 470	0,08	0,05	0,03	

Aus dem Obenstehenden scheint hervorzugehen, daß man bei thyreoidectomierten Pferden eine größere Extraktmenge findet als bei solchen, die noch ihre Glandula thyreoidea haben. Vergleicht man in beiden Gruppen die Zahlen aller drei Kolonnen, ersieht man daraus, daß sowohl das Citratblut als auch das Serum bei den thyreoidectomierten höhere Werte als bei den anderen geben, während dagegen die Differenz zwischen der Menge im Citratblut und der Menge im Serum, d. h. die Fett-Cholesterinmenge in den Blutkörpern (und im Fibrin), aufs genaueste gleich ist (bzw. 0,025 und 0,023 Proz.).

Bei normalen Pferden finden wir also nur eine sehr geringe Fett-Cholesterinmenge im Serum: 0 bis 0,01 Proz. (s. auch die Tabelle II), während die Blutkörper eine gewisse größere Menge enthalten, etwa 0,025 Proz. Bei den thyreoidectomierten Pferden war die Durchschnittsmenge im Serum 0,037 Proz. Zusammengenommen bestätigen diese Beobachtungen, was man ja nach *Bloors* Untersuchungen[1]) auch von vornherein vermuten mußte, daß eine eventuelle Vergrößerung der Extraktmenge jedenfalls hauptsächlich im Serum zu finden sein müsse.

Im Vergleich mit den Werten, welche wir bei Menschen finden[2]), sind all diese Werte jedoch nur gering. Daß dies auf Arteigentümlichkeiten

[1]) Physiol. Rev. 1922, S. 92.

[2]) *Bing* und *Heckscher*, Unters. über Lipämie, II., diese Zeitschr. 149, 82, 1924.

beruht, wird wohl von vornherein das Wahrscheinliche sein, aber auch die alimentären Verhältnisse bieten ja bei Untersuchungen über den Fett-Cholesterininhalt des Blutes ein gewisses Interesse dar.

Die Fettmengen, welche man unter gewöhnlichen Umständen den Pferden zuführt, sind sehr klein, indem die gewöhnlich angewandten Futtermittel nur wenig Fett enthalten. So findet man in Gerstenkernen nur 1,7 Proz., in Mais nur 4,2 Proz., in Weizenkleie 3,1 Proz., in Heu, mit Klee gemischt, 1,1 Proz. und in Stroh 0,5 Proz. verdauliches Fett, während Rüben, praktisch gesprochen, kein Fett enthalten. Es zeigte sich deshalb schwierig, ein fettreiches Futter zusammenzustellen, um so mehr, als die Pferde sehr wählerische Tiere sind, welche man auf keinerlei Weise zwingen kann, nicht mal durch Zwangsfüttern, gewöhnliches, animalisches (Schweine-) Fett zu sich zu nehmen. Indessen gelang es, ein Futtermittel zu finden: „*Maisfett*", ein Maisprodukt, welches die Pferde nach einiger Angewöhnung mit leidlichem Appetit fraßen. Die chemische Analyse dieses Maisfetts zeigte einen Inhalt von etwa 1,5 Proz. Stickstoff, etwa 2,5 Proz. Salze (Aschenbestandteile) und *etwa 40 Proz. Rohfett*, also einen sehr beträchtlichen Fettinhalt. Dieser Stoff wurde mit einigermaßen gleichen Teilen Kleie gemischt; er wurde ausgezeichnet vertragen. Die Verdauung der Pferde während der Zeit, wo sie diese Futtermischung fraßen, war eher ein wenig mehr träge als gewöhnlich. Die Menge der Abführung war recht sparsam, und diese Tatsache nebst dem Aussehen der Abführung (trocken, körnig) deuten darauf hin, daß jedenfalls der größte Teil des Fettes resorbiert worden ist.

Vermittelst dieses „Maisfetts" wurden folgende Versuche ausgeführt, welche über die Größe einer eventuellen alimentären Steigung der Fett-Cholesterinmenge des Blutes während Füttern mit einem Futter, fetthaltiger als das gewöhnliche, Auskunft zu schaffen bezweckte. Der Versuch wurde mit drei normalen und sechs thyreoidectomierten Pferden, die während 7 Tagen nur „Maisfett"-Kleiemischung und etwas Heu bekamen, ausgeführt. Die verschiedenen Pferde fraßen ziemlich ungleiche Mengen, welches sie übrigens auch bei gewöhnlichem Füttern zu tun pflegten; die Thyreoidectomierten fraßen weniger als die Normalen, und unter den Thyreoidectomierten fraßen wiederum Nr. 417 und 442 weniger als die anderen. Die unter den normalen Pferden am besten Fütternden fraßen beinahe doppelt soviel als die am schlechtesten Fütternden unter den Thyreoidectomierten; für alle neun Pferde berechnet, war die tägliche Durchschnittsration von „Maisfett" etwa 3,7 kg, d. h. etwa 1,5 kg Rohfett. Unter der Tabelle II findet man die Angabe der Fettmenge im Serum bei den verschiedenen Pferden vor, während und nach der siebentägigen Fütterungsperiode. Man bemerke doch, daß die Pferde den ersten Tag, bis der Hunger und die Ange-

wöhnung ihre Wirkung ausübten, nur wenig fraßen. Das „Maisfett" wurde gleichmäßig unter die verschiedenen Futter den Tag hindurch verteilt; die Blutproben wurden mittels Venaepunktur jeden Tag beinahe zur selben Zeit, 3 bis 4 Stunden nach dem ersten großen Morgenfutter, genommen. Die Werte sind in der Tabelle II angegeben.

Tabelle II.
Proz. in Serum

	Normale Pferde			Thyreoidectomierte Pferde					
Nr.:	494	495	497	417	442	456	467	470	474
Vorher	0,01	0,00	0,01	0,05	0,06	0,03	0,01	0,01	0,02
Während „Maisfett"-Fütterung 1. Tag	0,02	0,03	0,02	0,07	0,11	0,04	0,05	0,03	0,05
2. „	0,04	0,02	0,03	0,05	0,10	0,03	0,03	0,01	0,03
3. „	0,00	0,00	0,01	0,07	0,16	0,03	0,02	0,03	0,04
4. „	0,00	0,00	0,00	0,08	0,15	0,02	0,02	0,02	0,03
5. „	0,00	0,00	0,00	0,05	0,17	0,00	0,00	0,00	0,03
6. „	0,00	0,00	0,00	0,05	0,13	0,03	0,02	0,00	0,04
7. „	0,00	0,00	0,00	0,05	0,05	0,02	0,00	0,00	0,01
Nachher									
1. Tag	0,00	0,00	0,00	0,02	0,06	0,04	0,00	0,00	0,03
2. „	0,00	0,00	0,00	0,03	0,04	0,03	0,02	0,00	0,03
3. „	0,00	0,00	0,00	0,03	0,07	0,03	0,03	0,02	0,02
4. „	0,01	0,01	0,00	—	—	—	—	—	—

Auch hier finden wir also im ganzen genommen eine größere Fett-Cholesterinmenge im Serum der thyreoidectomierten Pferde als bei den Normalpferden, deutlich sowohl vor Anfang der Fütterung mit „Maisfett", als auch in den Tagen nach Aufhören dieser „Maisfett"-Fütterung, jedoch aber weit deutlicher während derselben. Zwar findet man auch bei den drei normalen Pferden ein geringes Ansteigen der Fettmenge während der zwei ersten Tage der „Maisfett"-Periode (vorübergehende Schwierigkeit der Assimilation ?); diese Steigerung ist aber schnell vorüber, und ist ja auch gering im Vergleich mit der Steigerung bei den thyreoidectomierten Pferden. Dennoch finden wir einen ansehnlichen Unterschied zwischen einzelnen dieser letzten Pferde. Dieser Unterschied zwischen den einzelnen thyreoidectomierten Pferden zeigt sich, sei es, daß man die Werte vor und nach der Fettfütterung, oder daß man die alimentären Steigungen während derselben betrachtet; es gibt einen Übergang von den Nr. 467 und 470 [welche beide bei einer früheren Untersuchung (s. Tabelle I) ein wenig höhere Werte als jetzt zeigten] über Nr. 456 und 474 zu den Nr. 417 und 442. Bei Nr. 467 und 470 finden wir vor, nach und während der „Maisfett"-Periode Zahlen, welche nur ganz wenig über den Zahlen der Normalpferde sind; bei Nr. 442 sind dagegen die Werte sehr beträchtlich. Und die Reihenfolge der Pferde ist dieselbe, ob wir die Werte vor der Fettfütterung oder die alimentäre Steigung betrachten.

Betrachtet man die Pferde selbst, erblickt man indessen auch Verschiedenheiten, so daß auch da eine Reihenfolge zu sehen ist. Die Veränderungen, die im Anschluß an die Thyreoidectomie mit den Pferden vorgegangen sind, sind sehr verschieden an Grad. In diesem Zusammenhang ist es von Interesse zu erfahren, daß diejenigen Pferde, welche von Anfang an von dem Personal des Seruminstituts als die von der Thyreoidectomie am meisten beeinflußten bezeichnet wurden, diejenigen also, welche am deutlichsten Fettansatz, Veränderungen des Haarwuchses, herabgesetzte Freßlust und Verlust der „Laune" zeigten, die beiden Pferde Nr. 417 und 442 waren, welche auch die größten Blutfettwerte aufzeigen konnten.

Über die Ursache dieser Variationen kann man sich freilich nur hypothetisch aussprechen; am wahrscheinlichsten wäre wohl die Annahme, daß die Thyreoidectomie nicht bei all den betreffenden Pferden eine totale gewesen sei. (Die Glandula thyreoidea ist bei Pferden nur von der Größe einer Nuß, in gewissen Fällen in mehrere *lobi* geteilt und schwer zu finden.)

Was nun auch die Ursache der Verschiedenheiten zwischen den einzelnen thyreoidectomierten Pferden sein möge, so verhüllen diese Variationen dennoch nicht dasjenige, welches hier die Hauptsache ist, nämlich den Unterschied, der, im ganzen genommen, zwischen den normalen und den anderen Pferden besteht, einen Unterschied, der sich in diesen Versuchen in solcher Weise zu erkennen gegeben hat, daß man daraus folgendes schließen kann:

1. Die Entfernung der Glandula thyreoidea bei einem gesunden Pferde erregt, nebst den bekannten somatischen und psychischen Störungen, eine Vergrößerung des Blutfett-Cholesterininhalts. Man findet diese Vergrößerung, auch wenn das Futter sehr fettarm ist.

2. Genau wie bei krankhaften Zuständen bei dem Menschen, bei welchem eine Vergrößerung der Fett-Cholesterinmenge des Blutes, d. h. eine Menge größer als normal bei fastenden Individuen[1]), soviel man weiß, immer von vergrößerten alimentären Steigungen begleitet ist, findet man bei den thyreoidectomierten Pferden nach der Fütterung mit Fett eine Steigerung der Blutfett-Cholesterinmenge, welche größer ist als bei normalen Pferden.

---

[1]) Siehe *Bing* und *Heckscher*, Unters. über Lipämie, III., diese Zeitschr. **149**, 90, 1924.

Über die Fett-Cholesterin-Menge des Blutes bei Kretinen.

Von

Hans Heckscher.

(Mitteilung aus dem Blegdamshospital, Kopenhagen.)

(Eingegangen am 24. März 1925.)

Diese kleine Untersuchungsreihe macht keinen Anspruch, das Thema zu erschöpfen; sie gibt nur eine erste Orientierung in bezug auf die Frage der Blutfett-Cholesterinmenge bei *Kretinismus*, welcher mit der *Basedow*schen Krankheit und dem *Myxödem* zusammen eine Krankheitsgruppe bildet, die durch Dysfunktion von Glandula thyreoidea gekennzeichnet ist.

Ein Däne, der Untersuchungen, wie die hier mitgeteilten, anzustellen wünscht, ist insofern unvorteilhaft gestellt, als er im eigenen Lande keine Kretinen findet; er muß ins Ausland reisen, nach Ländern, in welchen der Kretinismus endemisch ist. Die vorliegenden Untersuchungen wurden an Kretinen in der *Steiermark*, *Österreich*, näher bezeichnet in den Bezirken *Murau* und *Judenburg*, vorgenommen, von allen Orten der Welt diejenigen, an welchen der Kretinismus am meisten verbreitet ist. Daß es mir, einem Fremden, überhaupt ermöglicht wurde, diese Untersuchungen anzustellen, verdanke ich der Hilfsbereitschaft und der Gastfreiheit einer Reihe österreichischer Ärzte:

Herrn Ministerialrat Dr. *Joseph Müller* und Herrn Ministerialrat Dr. *Schroetter-Kristelli* aus dem Volksgesundheitsamte, *Wien*; Herrn Professor Dr. *Wagner Jauregg*, Wien; Herrn Oberbezirksarzt Dr. *Czacki*, *Murau*; Herrn Bezirksarzt Dr. *Mach*, *St. Peter*; Herrn Bezirksarzt Dr. *Haim*, *Schröder*; Herrn Bezirksarzt Dr. *Wesely*, *Stadl a. d. Mur*, samt Herrn Sanitäts-Konsulent Dr. *Pachmayer*, *Knittelfeld*, welchen Kollegen ich hierdurch meinen besten Dank ausspreche.

Die Personen, ausschließlich Kinder, welche ich in *Knittelfeld* zu untersuchen Gelegenheit hatte, waren alle im dortigen Siechenhaus untergebracht; die anderen Kretinen wurden alle an ihrem Wohnort untersucht. Was diese letzteren betrifft, so war es mir, innerhalb der mir zugemessenen Zeit, nicht möglich, die Untersuchungen, während die

Betreffenden noch fastend waren, anzustellen, und zwar wäre dies ja eigentlich das beste gewesen, indem man aus Arbeiten von *Bang* (1), *Gade* (2) und *Bing* und *Heckscher* (3) weiß, daß die Einnahme von fetthaltiger Nahrung den Fett-Cholesterininhalt des Blutes vermehrt. Ich glaube aber kaum, daß jene Tatsache in diesem Zusammenhang eine größere Rolle spielt, denn es bedarf in der Tat recht großer Fettmengen, um auch nur eine meßbare Vergrößerung der Blutextraktmenge zu geben, und die Bevölkerung der betreffenden Gegenden nährt sich von einer knappen und keineswegs fettreichen Kost; dazu kommt, daß die Kretinen im allgemeinen weniger als normale Menschen essen, und daß sie, was mir über mehrere von ihnen berichtet wurde, besonders ungern fetthaltige Speisen essen. Die Kinder in *Knittelfeld* wurden teils fastend, teils nach Einnahme einer bestimmten, ziemlich großen Fettmenge (Funktionsproben) untersucht. Die Bestimmung der Blutfett-Cholesterinmenge wurde nach der von *Bing* und *Heckscher* (4) und (5) angegebenen Methode getan.

Das Auswählen und die Einteilung der Individuen waren in vielen Fällen gar schwierig, indem es mir aus praktischen Gründen nicht möglich war, den Betreffenden eine gründlichere Untersuchung zukommen zu lassen. Deshalb schaltete ich sofort eine Anzahl der Personen, welche mir zur Untersuchung gebracht wurden, aus, und habe nur diejenigen mitgenommen, von denen ich meinte, daß sie mit leidlicher Sicherheit klassifiziert werden konnten.

Das Kretinenmaterial selbst habe ich in zwei Gruppen eingeteilt: *A. Kretinen*, bei denen die kretinösen Züge vorherrschend waren, ganz den klassischen Beschreibungen entsprechend, und *B. Kretinöse, Kretinoiden*, bei welchen diese Züge weniger hervortretend, obwohl unverkennbar waren, bei welchen also die Hemmung des Wuchses, die Deformitäten, die Hautveränderung, der Gesichtsausdruck und die psychischen Defekte nur leichteren Grades waren. Schließlich habe ich unter der Gruppe *C* einige *Strumapatienten* mitgenommen, die zwar von der Bevölkerung des Ortes als Kretinen, „Trottel", betrachtet wurden, denen aber meines Erachtens die sicheren Anzeichen des Kretinismus fehlten; jedes dieser letzten Individuen zeigte, außer der Struma, einen Geistesdefekt verschiedenen Grades, von leichter Imbezilität bis zur völligen Idiotie.

Als Grundlage für eine Schätzung der Größe und des Gewichts bei den verschiedenen Personen habe ich die in *Feers* Lehrbuch der Kinderheilkunde 1919 von *Thiemisch* angegebenen Tabellen über die Größe und das Gewicht eines Durchschnittskindes benutzt; diese Tabellen stimmen übrigens aufs genaueste mit den in Dänemark geltenden überein (*Monrad* in Lägeforeningens Aarbog 1924). Als Mittelgröße bei Individuen von 18 Jahren und darüber habe ich mit 170 cm gerechnet; die Angaben in den untenstehenden Tabellen von „100 Proz. normaler Größe" bedeuten deshalb, daß die betreffende erwachsene Person wenigstens 170 cm maß. Die Beurteilung der Größe einer Struma geschah nach der bildlichen Angabe in einem Schema, von dem *österreichischen Volksgesundheitsamt* zu dem Zwecke angefertigt, bei der Einsammlung von Auskünften über das Vorkommen

von Struma bei Schulkindern Verwendung zu finden. Die Abbildungen dieses Schemas zeigen die Größe von Strumas, welche ich bzw. als I, II und III bezeichnet habe. Die Bezeichnung VI habe ich nur von den ganz exzessiven Strumas benutzt.

Die gefundenen Werte der Blutfett-Cholesterinmenge sind in den Tabellen I bis IV aufgeführt. Die *Funktionsproben* wurden nach Eingabe von 150 g dicker Sahne, „Schlagobers" (etwa 35 g Milchfett), nebst einer halben Semmel ausgeführt. In der Tabelle IV findet man die Resultate von Funktionsproben an einer Reihe dänischer Knaben, alle Rekonvaleszenten nach leichter *Diphtheria faucium* afebril und bei völligem Wohlbefinden; hier wurde dieselbe Fettmenge nebst einem großen Zwieback mit 5 g Margarine eingegeben.

Tabelle I.

A. Kretinen.

Name	Geschlecht	Alter	Struma	Höhe Proz.	Gewicht Proz.	Bezirk	Fett-Cholesterinmenge Proz.
Friedel, P. . . .	m	7	I	92	—	Murau	0,12
Pirke, H.	m	7	0	88	—	Schöder	0,08
Backer, S.	m	8	I	86	—	Ranten	0,12
Hotter, F.	m	10	I	83	60	Knittelfeld	0,08
Stuhlpfarrer, J. .	q	12	0 ?	77	60	„	0,11
Anthofer, F. . . .	m	14	II	97	—	Ranten	0,18
Unterweger, A. .	m	14	I	83	—	Schöder	0,15
Urbanitsch, A. . .	q	15	0	67	50	Knittelfeld	0,10
Wind, H.	q	15	II—III	86	—	Schöder	0,18
Wind, A.	q	16	I	82	—	„	0,16
Pfeiffenberger, K.	m	17	I	73	—	St. Peter	0,22
Stöckl, T.	q	20	0	69	—	Stadl a. d. Mur	0,14
Pfeiffenberger, S.	m	22	I	79	—	St. Peter	0,15
Zebitsch, J. . . .	m	25	IV	80	—	„	0,16
Pfeiffenberger, F.	m	25	I	77	—	„	0,14
Lederwasch, E. .	q	45	III	72	—	Ranten	0,14
Bliem, M. . . .	q	60	II	75	—	Stadl a. d. Mur	0,16

Aus der Tabelle I ergibt sich, daß bei den meisten Individuen der Gruppe A die gefundenen Werte der Blutfett-Cholesterinmenge größer sind als 0,12 Proz., welche laut *Bing* und *Heckscher* (3) als die größte normale Menge angesehen werden muß; diese Vergrößerung der Extraktmenge findet sich bei 11 von 17 Kretinen; die Zahlen variieren zwischen 0,13 und 0,22 Proz. Ferner geht aus dieser Tabelle hervor, daß die Werte, im ganzen genommen, in dem eigentlichen Kindesalter niedriger sind als bei Halberwachsenen und Erwachsenen.

In der Tabelle II, welche die Verhältnisse bei den Kretinoiden angibt, tritt dies weniger scharf hervor, jedoch wird die Vergrößerung der Fett-Cholesterinmenge auch hier häufiger, je nachdem die unter-

Tabelle II.

B. Kretinöse, Kretinoiden.

Name	Geschlecht	Alter	Struma	Höhe Proz.	Gewicht Proz.	Bezirk	Fett-Cholesterinmenge Proz.
Blühm, F. . . .	m	7	I	—	—	Ranten	0,10
Amberger, F. . .	q	7	I	91	—	Murau	**0,18**
Baüchler, F. . . .	m	9	0	110	112	Knittelfeld	0,12
Bacher, A. . . .	q	10	I	95	—	Ranten	0,08
Eichholzer, A. . .	q	10	I	92	—	Murau	0,10
Glitzner, J. . . .	q	10	0	91	79	Knittelfeld	0,10
Wind, J.	m	11	III	92	—	Schöder	**0,18**
Bär, F.	m	11	I	94	—	Knittelfeld	0,12
Blühm, P. . . .	m	12	I	—	—	Ranten	0,12
Tanner, V. . . .	q	12	IV	94	—	Schöder	**0,15**
Zeritsch, A. . . .	m	12	I	100	85	Knittelfeld	0,12
Unger, A.	m	13	0	93	86	„	0,12
Bär, J.	q	14	0	88	69	„	0,10
Kauffmann, M. .	q	18	II	100	—	Ranten	**0,18**
Oberwandling, H.	m	18	II	89	—	Schöder	**0,14**
Kolan, J.	m	29	II—III	87	—	„	0,10
Sperl, R.	m	50	III	100	—	„	**0,18**
Lederwasch, F. .	m	50	II	82	—	Ranten	0,10
Guster, A.	q	etwa 55	III	—	—	„	**0,16**
Kirschbaumer, M.	q	etwa 60	II	100	—	Stadl a. d. Mur	**0,18**
Haas, H.	q	65	IV	100	—	St. Peter	0,12

Tabelle III.

C. Struma ohne Morbus Basedowii, Myxödem oder Kretinismus.

Name	Geschlecht	Alter	Struma	Höhe Proz.	Gewicht	Bezirk	Fett-Cholesterinmenge Proz.
Feisch, K. . .	m	10	I	90	—	Schöder	0,12
Mohr, C. . . .	m	15	I	94	—	Ranten	0,11
Bär, E.	q	21	II	100	—	Murau	0,12
Lintschinger, I.	q	21	III	95	—	St. Peter	0,11
Kolan, W. . .	m	27	III	100	—	Schöder	0,08
Lüschberger, I.	m	60	III	100	—	Murau	0,11

suchten Personen in die Jahre kommen. Von den 22 Individuen dieser Gruppe gaben im ganzen nur 9 Werte über dem Normalen, also verhältnismäßig weniger als in der Gruppe A, wo jedenfalls alle Individuen über 15 Jahre Hyperlipämie zeigten. Auch die erhöhten Werte selbst sind durchschnittlich geringer in der Tabelle II als in der Tabelle I. Was die Gruppe C betrifft, so fanden sich hier in sämtlichen Fällen normale Werte.

Sowohl unter den Kretinen als unter den Kretinoiden fand man also einige Individuen, besonders Kinder, deren Blutfett-Cholesterinmenge innerhalb der Grenzen des Normalen war. Dennoch ergibt es

Tabelle IV.
Funktionsproben.

Name	Geschlecht	Alter	Fett-Cholesterinmenge		
			fastend Proz.	4 Stunden p. c. Proz.	6 Stunden p. c. Proz.
		Kretinen:			
Hotter, F.	m	10	0,08	**0,15**	**0,14**
Stuhlpfarrer, J. . .	q	12	0,09	**0,17**	0,10
Urbanitsch, A. . .	q	15	0,09	0,13	**0,18**
		Kretinoiden:			
Glitzner, J.	q	10	0,10	0,12	0,12
Bär, F.	m	11	0,12	0,14	**0,14**
Zeritsch, A. . . .	m	12	0,10	0,10	0,10
Bär, J.	q	14	0,10	**0,20**	**0,15**
		Normale Kinder:			
	m	6	0,10	0,11	0,10
	m	7	0,10	0,12	0,11
	m	7	0,09	0,11	0,11
	m	7	0,06	0,09	0,08
	m	8	0,06	0,11	0,09
	m	8	0,08	0,14	0,10
	m	9	0,09	0,09	0,09
	m	11	0,06	0,09	0,07
	m	12	0,07	0,10	0,09
	m	13	0,09	0,12	0,08

sich aus den in der Tabelle IV angegebenen Funktionsprobe-Resultaten, daß jedenfalls in einigen dieser Fälle Störungen des Fettstoffwechsels vorkamen.

Wenn man die Werte, die je 4 und 6 Stunden nach der Mahlzeit gefunden wurden, mit den entsprechenden bei den normalen Kindern vergleicht, ersieht man daraus, daß die alimentären Ausschläge bei allen drei Kretinen und jedenfalls bei zwei der Kretinoiden größer sind als die normalen. [Über die Verhältnisse bei normalen erwachsenen Personen siehe *Bing* und *Heckscher* (3)]. Bei diesen Personen, bei welchen „die fastende" Fett-Cholesterinmenge normal, während die alimentären Steigungen größer als normal waren, gab es also eine „*latente*" Vergrößerung der Fett-Cholesterinmenge des Blutes.

Zusammenfassung.

1. Eine Vergrößerung gemäßigten Grades der Fett-Cholesterinmenge des Blutes findet sich so häufig bei halberwachsenen und erwachsenen Kretinen, daß dieselbe als eine Regel betrachtet werden muß.

2. Bei Kretinen, die noch Kinder sind, ist die Fett-Cholesterinmenge meistens normal; dennoch kann man hier in gewissen Fällen eine *latente Vergrößerung* nachweisen.

3. Bei Individuen mit leichteren Symptomen an Kretinismus, bei den Kretinoiden, ist die Vergrößerung der Blutfett-Cholesterinmenge geringer und nicht so konstant. Nicht selten wird indessen auch hier eine Funktionsprobe eine *latente Vergrößerung* enthüllen können.

4. Die untersuchten *Struma*patienten zeigten normale „fastende" Extraktmenge.

Literatur.

1) *Ivar Bang*, Über Lipämie, II, diese Zeitschr. **91**, 104, 1918. — 2) *H. E. Gade*, Die alimentäre Lipämie, Bibliotek for Läger 1919. — 3) *Bing* und *Heckscher*, Unters. über Lipämie, II, diese Zeitschr. **149**, 83, 1924. — 4) *Dieselben*, Unters. über Lipämie, I, ebendaselbst **149**, 79, 1924. — 5) *Dieselben* **158**, 395, 1925.

Über die Verbrennungswärme der Brenztraubensäure und ihre physiologische Bedeutung.

Von

Hermann Blaschko.

(Aus dem Kaiser Wilhelm-Institut für Biologie, Berlin-Dahlem.)

(Eingegangen am 24. März 1925.)

Wie in der Arbeit von *O. Meyerhof*, *K. Lohmann* und *R. Meier*[1] kürzlich gezeigt wurde, wird Brenztraubensäure in ähnlicher Weise unter Aufwand von Oxydationsenergie zu Kohlehydrat synthetisiert wie Milchsäure. Um die Energetik dieser Synthese aufzuklären, bedurfte es der Kenntnis der Verbrennungs- und Umsatzwärmen der Brenztraubensäure. Da diese bisher ungenügend bekannt waren, habe ich sie auf Vorschlag von Herrn *Meyerhof* gemessen.

Allerdings machen die französischen Autoren *Wurmser* und *Aubel* in verschiedenen ihrer energetischen Berechnungen von der Verbrennungswärme der Brenztraubensäure Gebrauch (Literatur siehe bei *O. Meyerhof*, *K. Lohmann* und *R. Meier*), wobei sie sich nach einer privaten Mitteilung eines Wertes von 155,8 cal molarer Bildungswärme bedienten, was 3005 cal Verbrennungswärme pro Gramm entsprechen würde. Diese Zahl erschien jedoch nicht recht glaubwürdig, weil dann die carboxylatische Spaltung zu Aldehyd und Kohlensäure eine nicht unbeträchtliche negative Wärmetönung besitzen würde, was bei ihrem freiwilligen Verlauf im Hefeextrakt unwahrscheinlich war und auch einer kürzlich von *Neuberg* gemachten Mitteilung widersprechen würde, daß diese Reaktion mit keiner meßbaren Wärmebildung verbunden ist[2].

I. Die Verbrennungswärme der Brenztraubensäure.

Für die Versuche reinigte ich das *Kahlbaum*sche Präparat durch wiederholte Destillation unter vermindertem Druck. Der Siedepunkt

[1]) Diese Zeitschr. **157**, 459, 1925.
[2]) Ebendaselbst **152**, 205, 1924.

der gereinigten Substanz betrug bei einem Druck von 9,1 mm Hg 58,3°. Im Kältegemisch kristallisierte die Säure schnell aus. Nach Ablauf von 3 Tagen wurde die Substanz stets neu destilliert.

Die Bestimmung der Verbrennungswärme wurde mit flüssiger wasserfreier Brenztraubensäure vorgenommen. Diese Bestimmungen führte ich in der Heizwertabteilung des Materialsprüfungsamts Berlin-Dahlem aus. Dem Abteilungsvorsteher Herrn Prof. *Deiss* bin ich für die Erlaubnis zur Benutzung der Einrichtung und Herrn Dr. *Nitsche* für seine Hilfsbereitschaft bei der Ausführung der Messungen zu Dank verpflichtet. Der Wasserwert der *Berthelot*schen Bombe wurde mit Benzoesäure (für kalorimetrische Zwecke, Verbrennungswärme 6325 cal) bestimmt. Die Zündung geschah in allen Versuchen mit dünnem Platindraht, der bis zum Durchschmelzen erhitzt wurde. Die Resultate der Wasserwertbestimmung sind in Tabelle I zusammengestellt.

Die Versuche wurden bei einer Temperatur von 14 bis 17° vorgenommen. Zur Ablesung diente ein geprüftes Beckmannthermometer. Wasserfüllung meist 2000 g; außerdem wurden jedesmal 5 ccm Wasser in den Boden der Bombe hineinpipettiert. Da jedoch in einigen Fällen eine andere Füllung benutzt wurde, wurden die Thermometerablesungen auf den Gradwert korrigiert.

Tabelle I.

Bestimmung des Wasserwerts der Bombe mit Benzoesäure (6325 cal).

Nr.	Gewicht g	Benutzte Wassermenge g	Korrigierter Temperaturanstieg °C	Verbraucht n/10 NaOH ccm	Berechnet cal	Korrigiert cal	Gesamtwasserwert	Wasserwert der Bombe
1	0,9418	2005	2,544	0,7	5956,9	5957,9	2342	337
2	0,9905	2005	2,673	0,9	6264,4	6266,2	2344	339
3	0,9880	2005	2,668	0,9	6249,1	6250,4	2343	338
4	1,0691	2005	2,893	2,5	6762,0	6765,5	2339	334
5	1,0266	2025	2,746	0,8	6493,2	6494,3	2365	340
							Mittelwert:	338

In der Tabelle II teile ich die endgültigen Resultate mit, die ich bei der Verbrennung der wiederholt durch Destillation gereinigten und getrockneten Brenztraubensäure erhalten habe. Die Brenztraubensäure wurde nach Destillation im Hochvakuum (mit der *Vollmer*schen Pumpe) über P_2O_5 getrocknet. In einer vorangehenden vorläufigen Serie von zehn Verbrennungen, bei denen die Substanz noch nicht so weitgehend gereinigt war, erhielt ich bei etwas größeren Schwankungen fast

den gleichen Mittelwert wie bei diesen endgültigen Bestimmungen, 3173,96 cal. Der Mittelwert der in der Tabelle II aufgeführten sechs Verbrennungen beträgt 3172,35 cal pro Gramm oder 279140 cal pro Mol.

Tabelle II.

Verbrennungswärme der Brenztraubensäure.

Nr.	Angewandte Substanzmenge g	Benutzte Wassermenge g	Gesamtwasserwert	Korrigierter Temperaturanstieg °C	Verbrauch an n/10 Lauge	Kalorien gebildet	Kalorien nach Abzug für gebildete HNO_3	Kalorien pro g Brenztraubensäure gebildet
1	0,9987	2005	2343	1,3569	1,5	3179,4	3177,3	3181,4
2	0,9112	2005	2343	1,2318	1,2	2886,58	2884,9	3166,8
3	1,0696	2005	2343	1,4430	1,2	3382,4	3380,72	3166,1
4	0,9596	2005	2343	1,2999	1,3	3045,6	3043,78	3172,0
5	1,0063	2005	2343	1,3629	0,9	3193,4	3192,14	3172,2
6	0,9451	2005	2343	1,2814	0,8	3002,4	3001,28	3175,6

Mittelwert: 3172,35
= 279 140 cal pro Mol.

II. Lösungs- und Neutralisationswärme der Brenztraubensäure.

Die Lösungs- und Neutralisationswärmen sind schon von älteren französischen Autoren bestimmt. *Simon*[1]) und *Massol*[2]) fanden als Lösungswärme 4400 bzw. 4280 cal, als Neutralisationswärme 11000 bzw. 11800 cal. Es erschien jedoch gut, diese Wärme mit gereinigter Säure zu kontrollieren. Die Wärme wurde in einem 100 ccm fassenden, vierwandigen Dewarbecher bestimmt, der sich in einem Kalorimetermantel befand. Die abgewogene Brenztraubensäure war in einem im Korken des Dewargefäßes befestigten Reagenzglas mit dünnem Boden, der nach Beendigung der Vorperiode mit einem Glasstab durchstoßen wurde. Außerdem tauchten noch ein Beckmannthermometer und ein Rührer, der durch Motorantrieb bewegt wurde, in das Gefäß. Der Wasserwert desselben, der schon früher bestimmt war, betrug mit Thermometer 17. Die Wasserfüllung war in allen Versuchen 100 ccm.

Die Bestimmung der Neutralisationswärme wurde auf die gleiche Weise vorgenommen wie die der Lösungswärme. Nur wurde das Dewargefäß mit einer Lösung von entsprechend verdünnter CO_2-freier Natronlauge gefüllt. Die Normalität dieser Lösung betrug 0,0479 n. Die Menge der Brenztraubensäure wurde im Überschuß über die Natronlauge gewählt. Die beobachtete Wärme setzte sich zusammen aus der Lösungs-

1) Bull. III, **9**, 112 und 836.
2) Bull. III, **33**, 336.

wärme der gesamten Brenztraubensäuremenge, die aus dem Gewicht und der Tabelle III zu berechnen war, und der Neutralisationswärme des neutralisierten Anteils der Brenztraubensäure, der der benutzten Menge Natronlauge entsprach. Die Ergebnisse sind in Tabelle III und IV enthalten.

Tabelle III.

Lösungswärme der flüssigen Brenztraubensäure.

Nr.	Angewandte Substanz g	Korrigierter Temperaturanstieg °C	Kalorien gebildet	Kalorien pro g	Kalorien pro Mol
1	0,5194	0,235	27,495	52,94	4658
2	0,6172	0,259	30,30	49,10	4321
3	0,5214	0,226	26,44	50,73	4463
4	0,4013	0,188	22,00	54,81	4823
			Mittelwert:	52,9	4566

Tabelle IV.

Neutralisationswärme der Brenztraubensäure.

Nr.	Angewandte Menge g	Davon neutralisiert g	Korrigierter Temperaturanstieg °C	Gesamtwärmebildung cal	Davon ab Lösungswärme cal	Neutralisationswärme cal	Neutralisationswärme	
							Kalorien pro g	Kalorien pro Mol
1	0,5512	0,4215	0,720	84,24	29,16	55,08	130,7	11 500
2	0,5047	0,4215	0,691	80,82	26,70	54,12	128,4	11 300

III. Lösungswärme des Acetaldehyds.

Die bekannteste biologische Umsetzung der Brenztraubensäure ist der von *Neuberg* entdeckte carboxylatische Zerfall in Acetaldehyd und Kohlensäure. Die Wärme dieser Reaktion läßt sich aus den Verbrennungs- und Lösungswärmen der Brenztraubensäure und des Acetaldehyds berechnen. Die thermochemische Gleichung lautet:

$$C_3O_3H_4\,aq \longrightarrow C_2OH_4\,aq + CO_2\text{ gasf.}$$

Für die Verbrennungswärme des Acetaldehyds haben *Berthelot* und *Delépine* einen Wert von 279300 cal pro Mol angegeben[1]). Es fehlt also nur die Lösungswärme des Acetaldehyds, die ich hierfür bestimmt habe.

---

[1]) Siehe *Landolt* und *Börnstein*, 5. Aufl., 1923, S. 1597.

Es wurde das käufliche Präparat von *Kahlbaum* benutzt, das mehrmals destilliert und in einem Kältegemisch aufgefangen wurde, bis es gegen Lackmus neutral reagierte. Der Acetaldehyd wurde in kleine, dünnwandige Glasgefäße eingefüllt, die dann zugeschmolzen wurden. Die Gefäße wurden von einem unten ringförmig umgebogenen Glasstabe am Boden des Dewargefäßes unter Wasser zerstoßen. Das Ergebnis von drei Bestimmungen findet sich in Tabelle V.

Tabelle V.

Lösungswärme des Acetaldehyds.

Nr.	Angewandte Substanz g	Korrigierter Temperatur-anstieg °C	Entwickelt cal	Kalorien pro g	Kalorien pro Mol
1	0,3041	0,263	30,77	101,2	4452
2	0,4974	0,433	50,66	101,8	4482,5
3	0,3651	0,320	37,44	102,6	4512
				Mittel:	4482

IV. Die Wärme der carboxylatischen Spaltung.

Die molare Verbrennungswärme gelöster Brenztraubensäure ergibt sich nach obigem zu 279140 — 4560 = 274580 cal, die des gelösten Acetaldehyds zu 279300 — 4480 = 274820 cal. Auf Grund dieser Zahlen muß die Spaltung der Brenztraubensäure ohne Wärmetönung verlaufen, da die geringe Differenz beider Werte ganz in die Fehlergrenzen der Bestimmung der Verbrennungswärme fällt. *Neuberg* hat in dem oben angeführten Versuch keine meßbare Wärmetönung gefunden. Da dieses Experiment mehr qualitativer Natur war, habe ich noch in einigen Versuchen die etwa bei der carboxylatischen Spaltung auftretende Wärme genauer quantitativ verfolgt.

Die kalorimetrische Versuchsanordnung folgte der Beschreibung von *O. Meyerhof* in Abderhaldens Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden[1]). Zu den Versuchen benutzte ich kleine dreiwandige Dewarkolben, die mit 60 ccm Flüssigkeit gefüllt wurden. Die Thermostatentemperatur betrug 23,935°. Da die Zimmertemperatur etwa bei 21° lag, wurde die für die Abkühlung gültige „theoretische Thermostatentemperatur" so bestimmt, daß ein Kontrollgefäß, mit Hefemazerationssaft gefüllt, nach Temperaturausgleich auf seinen Temperaturgang

[1]) Abderhaldens Handb. d. biol. Arbeitsmethoden, Abt. IV, Teil 10, S. 755.

genau beobachtet wurde und unter Benutzung des mittleren Abkühlungskoeffizienten des Dauergefäßes von 9,1 Proz. die „Nulltemperatur" unter der Annahme berechnet, daß in diesem Gefäß keine Wärmebildung statthat. Die so bestimmte Temperatur betrug 23,811°. Auf diese Weise wurden die gemessenen Temperaturanstiege korrigiert. Es kommt so auch jede durch etwaige Selbstgärung des Saftes hervorgerufene Wärmebildung bei der Berechnung in Wegfall.

Die zum Versuch benutzte Brenztraubensäure wurde mit NaOH soweit neutralisiert, daß ihr p_H der des angewandten Hefemazerationssafts entsprach (= 6,6). Zu Beginn wurden 58 ccm des Hefeextrakts in den Kolben eingefüllt und in eine umgebogene, 2 ccm fassende Pipette[1]) die neutralisierte Brenztraubensäurelösung gegeben, die stets 0,155 g Brenztraubensäure enthielt. Nach Temperaturausgleich wurde der Inhalt der Pipette durch Stickstoff ausgeblasen und weiter langsam Gas durch das Gefäß geleitet. Die umgesetzte Menge Brenztraubensäure wurde am Schlusse nach Enteiweißung des Saftes jodometrisch nach *Wielands*[2]) Angaben ermittelt. 1 ccm n/100 Thiosulfatlösung entspricht einer Brenztraubensäuremenge von 0,1467 mg. In zwei derartigen Versuchen, ebenso in einem dritten, bei dem der Brenztraubensäureumsatz nicht gemessen wurde, erfolgte unmittelbar nach dem Zusatz der Brenztraubensäure ein Temperaturanstieg, der dann nach längerer oder kürzerer Zeit einem Abfall der Temperatur Platz machte. Die Erklärung für diesen anfänglichen Anstieg ist wohl in einer Lösung von Kohlensäure in dem Saft zu suchen. Im weiteren Verlauf wird der Überschuß an Kohlensäure entfernt, wodurch die Temperatur wieder sinkt. Ob die Kohlensäure am Schlusse völlig ausgetrieben ist, sei dahingestellt. Jedenfalls berechnet sich aus den beiden durchgeführten Versuchen im ganzen nur eine molare Wärme von 580 und 1420 cal, also noch nicht ½ Proz. der Verbrennungswärme. Als weiterer Umstand ist noch in Betracht zu ziehen, daß für den neutralisierten Teil der Brenztraubensäure Natriumbicarbonat entsteht. Die Neutralisationswärme der Brenztraubensäure und der Kohlensäure (1. Stufe) sind fast genau gleich, die erstere 11400, die letztere 11200 cal. Andererseits bleibt aber diese Kohlensäure des Bicarbonats in der Lösung, während ja die Verbrennungswärme auf gasförmige Kohlensäure berechnet ist. Auch dieser Umstand muß, falls unsere obige Berechnung zutrifft, zu einer geringen positiven Wärme Anlaß geben.

Im folgenden sind die Daten der beiden Versuche enthalten.

---

[1]) Siehe *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **195**, 46, 1922.
[2]) Liebigs Ann. **436**, 232, 1924.

Tabelle VI.

Bestimmung des Brenztraubensäureumsatzes.

a) Titration.

Nr.	Zur Bestimmung verwandte Menge Saft ccm	Im gleichen Volumen Saft allein verbraucht n/100 Thiosulfat*) ccm	Nach dem Versuch verbraucht n/100 Thiosulfat ccm	Am Schluß vorhandene Menge Brenztraubensäure mg	Umgesetzte Menge mg
1	0,4566	6,72	10,84	79	76
2	0,2283	5,70	8,10	75	80

*) Der Jodverbrauch des enteiweißten Saftes ist bei der Bestimmung in Abzug gebracht.

b) Wärmemessung.

Nr.	Maximaler Temperaturanstieg im Versuch	Endgültige korrigierte Temperaturdifferenz	Versuchsdauer	Wasserwert	Umgesetzte Brenztraubensäuremenge mg	Kalorien gebildet
1	0,017°	0,007°	1h 12′	70	76	0,5
2	0,050	0,018	3 15	70	80	1,2

Die Sekretion der Harderschen Drüse unter dem Einfluß einiger Substanzen.

Von

S. Belfanti.

(Aus dem serotherapeutischen Institut zu Mailand.)

(Eingegangen am 24. März 1925.)

Die *Harder*sche Drüse hat unter den Drüsen des tierischen Organismus vom physiologischen Standpunkt aus stets ganz wenig Aufsehen erregt; es wurde sogar ihr Vorkommen im menschlichen Körper geleugnet, obgleich unser großer Anatom *Giacomini* deren Spur im Auge der Leiche eines Buschmanns zu entdecken glaubte.

Bei Tieren, die mit einem dritten Augenlid versehen sind, und namentlich bei Meerschweinchen wie bei Kaninchen, entwickelt sich die Drüse in solchem Maße, daß sie zu den umfangreichsten des Organismus dieser Nagetiere gehört, bei denen sie auch mit dem Namen *Drüse des dritten Augenlids* bekannt ist[1]).

Die *Harder*sche Drüse besteht aus einem Fettgewebe und gehört also zu den Fettdrüsen. Man vermutet, sie diene zur Befeuchtung des Augenlids, um das Hin- und Hergleiten des Augapfels zu erleichtern; es ist dieses wenigstens die einzige Andeutung auf ihre Funktion, welche selbst in neueren Lehrbüchern der Physiologie zu finden ist, obgleich dieselbe dem Umfang der Drüse nicht angepaßt zu sein scheint.

Wegen ihres reichen Fettgehalts und ihrer besonderen physiologischen Beschaffenheit wurde sie von einigen Forschern (*Löwenthal, Bruni* usw.) der Milchdrüse nahegestellt.

Näher auf die anatomischen und histologischen Einzelheiten dieser schon 1660 vom Engländer *Harder* entdeckten Drüse einzugehen, ist nicht Aufgabe dieser kurzen Mitteilung, und ich verweise den darüber Aufklärung wünschenden Leser auf die zahlreichen Arbeiten, welche sich damit befassen, und von denen einige am Schlusse angeführt sind.

---

[1]) Eigentlich sind es zwei Drüsen, welche Fett sezernieren, die sogenannte Drüse des dritten Augenlids und die *Harder*sche Drüse.

Ich beabsichtige an dieser Stelle auf das Verhalten hinzuweisen, das die *Harder*sche Drüse unter dem Einfluß einiger organischer Eiweißkörper an den Tag legt, gerade als hätten dieselben die spezifische Wirkung ihre Funktion übermäßig stark anzuregen.

Bei gewöhnlichen Umständen läßt sich die Sekretion der *Harder*schen Drüse nicht erkennen, weil sie sich im Konjunktivalsack mit jener der Tränendrüse vermischt; sie unterscheidet sich jedoch von letzterer wegen ihres milchigen Aussehens, das an ein eitriges Sekret erinnert.

So fiel mir eines Tages zufällig folgende Tatsache auf: ich spritzte einem Meerschweinchen intravenös Aalserum ein und beobachtete dabei während der dem Tode vorausgehenden Konvulsionen im inneren Augenwinkel des Tieres eine reichliche, milchig-weiße Sekretion. Bei der mikroskopischen Prüfung ergab sich, daß dieselbe anstatt aus Leucocyten, aus winzig kleinen, stark lichtbrechenden Tröpfchen bestand, die sich unter der Wirkung von Osmiumsäure oder von Sudan III als Fetttröpfchen identifizieren ließen. Bei 400 bis 500 g schweren Meerschweinchen entfaltete das Aalserum diese Wirkung in einer Dosis von 0,20 ccm.

Diese fettbildende Wirkung des Ichthyotoxins vom Aal ist unabhängig von seiner Toxizität; in der Tat verliert sich erstere mit dem Erhitzen und mit dem Altern des Serums, während die toxische Wirkung unter gleichen Umständen erhalten bleibt.

Im Aalserum ist demnach ein Faktor vorhanden, der geschaffen ist beim Meerschweinchen (nicht beim Kaninchen) *die Funktion der Harderschen Drüse anzuregen*; es handelt sich dabei um eine für Aalserum gewissermaßen spezifische Wirkung, da bei Verwendung anderer Sera die Reizwirkung ausbleibt.

Auch beim Meerschweinchen im anaphylaktischen Zustand läßt sich zuweilen während der dem Tode vorausgehenden Konvulsionen die gleiche Erscheinung beobachten; es kommt dieses aber selten vor und niemals mit der für Aalserum charakteristischen Intensität.

Die angeführten Tatsachen können höchstens beweisen, daß sich beim Meerschweinchen, zum Unterschied vom Kaninchen, der Inhalt der *Harder*schen Drüse mit einer gewissen Leichtigkeit in die Abführungskanäle ergießt.

Das histologische Studium der unter der Wirkung des Ichthyotoxins stehenden Drüse des Meerschweinchens zeigt in der Tat, daß sowohl die acinösen Kanälchen wie die großen Kanäle mit Fett überfüllt sind, das sich mit Sudan III leicht färbt. Es hat den Anschein, als ob das in den Zellen enthaltene Fett auf unbekannte Art und Weise herausgeschleudert worden sei, so daß es das Lumen der Kanäle ausfüllt.

Diese Erscheinung könnte als das Resultat einer einfachen Hypersekretion, infolge einer heftigen Reizwirkung, aufgefaßt werden, was aber

bei einer funktionell so wenig bekannten Drüse sonderbar scheinen dürfte. Wir wissen in der Tat, daß der intravenösen Einspritzung von Aalserum eine plötzliche Überreizung verschiedener Drüsensekretionen auf dem Fuße folgt (Speichelfluß, Spermatorrhöe) geradeso, wie dies auch bei der Anaphylaxie erzeugenden Reinjektion der Fall ist; es könnte demnach obige Fettsekretion auf der gleichen Ursache beruhen.

Meine Aufmerksamkeit wurde jedoch auch von anderen Beobachtungen gefesselt, welche zur gleichen Erscheinung führen und bei denen ein physiologischer Zusammenhang besteht, der besser als der anaphylaktische oder ichthyotoxische Shock geeignet ist, die Ursache einer solchen Hypersekretion der *Harder*schen Drüse zu beleuchten.

Der bekannte Mykologe *Ferri* gibt in seinem schönen Werke über *eßbare und giftige Schwämme* eine praktische Methode an, welche die Erkennung der getrockneten Stengel eines giftigen Schwammes, *Agaricus muscarius*, ermöglicht. Es besteht dieselbe eben in der Beobachtung des Auftretens eines milchigen Tränenflusses beim subkutan mit dem wässerigen Extrakt des verdächtigen Schwammstengels eingespritzten Meerschweinchen. Auch in diesem, wie im obigen Falle, ist die Reaktion, welche ebenfalls beim Kaninchen ausbleibt, auf Fett zurückzuführen, das gewaltsam aus den Ausgangskanälen der *Harder*schen Drüse herausgepreßt wird.

In diesem Falle ist die Giftwirkung streng von der Fettwirkung getrennt, was die Behauptung gestattet, daß nicht der anaphylaktische oder toxische Shock die Ursache der Drüsenhypersekretion sei, sondern daß bei der Erscheinung ein anderer spezifischer Faktor ins Spiel trete.

Logischerweise kam ich auf den Gedanken, es sei die *Ferri*sche Reaktion (dieser Name gebührt meines Erachtens der Reaktion zur praktischen Erkennung des *Agaricus muscarius*, die nicht einmal in den neuesten Lehrbüchern der Pharmakologie angegeben ist) auf die Gegenwart des im Extrakt in Lösung übergegangenen Muscarins zurückzuführen. Das Muscarin ist ein von den Pharmakologen am gründlichsten studiertes Alkaloid, wenn sich auch die Lehrbücher nur mit seiner Wirkung auf die Tränendrüsensekretion befassen, während von der *Harder*schen Drüse nicht die Rede ist.

Es ist mir geglückt, von Prof. *Contardi*, dem ich an dieser Stelle meinen Dank ausspreche, zusammen mit anderen Präparaten, auf die ich später zurückkommen werde, ein wenig Muscarin zu erhalten, das von ihm selbst aus dem *Agaricus muscarius* gewonnen wurde.

Intravenös bei Meerschweinchen eingespritzt, führt das Naturmuscarin, auch bei der hohen Verdünnung von 1:5000, zum Auftreten einer milchigen Sekretion, die genau der bei der Ferrischen Reaktion beobachteten entspricht.

Was die chemische Beschaffenheit des Muscarins betrifft, so ist zwar dessen grobe Formel bekannt, es bestehen aber Zweifel über die

strukturelle Formel und noch mehr über die Identität zwischen letzterer und der Formel des synthetischen Präparats.

Bei der an Proben des synthetischen Produkts (die ich ebenfalls Prof. *Contardi* verdanke) angestellten biologischen Prüfung ergab sich, *daß das synthetische Muscarin beim Meerschweinchen selbst in Dosen, welche um das Hundertfache die vom Naturprodukt angewendeten überstiegen, die Fettsekretion und den Tränenfluß kaum merklich anregte.*

Dieser Beobachtung zufolge schien es angezeigt, das Verhältnis zu ergründen, das etwa zwischen der obigen physiologischen Wirkung und der chemischen Struktur des Produkts bestehen könnte, und da das Muscarin ein Derivat der Tetraalkylammoniumgruppe darstellt, so kam ich auf den Gedanken, mit anderen Substanzen der gleichen Serie Versuche anzustellen.

Bekanntlich werden die Vertreter dieser Derivatgruppe mit der folgenden schematischen Formel dargestellt, bei welcher R′ — R″ — R‴ untereinander identische oder verschiedene organische Radikale sind.

$$OH \, . \, N(R)(R_1)(R_2).$$

Dank der stark basischen Natur dieser Produkte kann das Hydroxyl von organischen oder anorganischen Säuren in Salz verwandelt werden. Die Säuren sind dabei imstande, die physiologische Wirkung der organischen Verbindung teilweise zu verändern; bei zweckmäßiger Wahl und Anordnung derselben ist jedoch diese Beeinflussung nicht derartig, daß sie die Abschätzung der physiologischen Erscheinung, soweit dieselbe auf der stickstoffhaltigen, organischen Base beruht, bedeutend beeinträchtigen könnte.

Zur Orientierung wurden anfangs die Versuche mit Ammoniumsalzen, und zwar mit $SO_4(NH_4)_2$ ausgeführt.

Es wurde eine Lösung hergestellt, welche pro Kubikzentimeter 1 cg Substanz enthielt; nach intravenöser Einspritzung von 2 ccm, also 0,02 g, war beim Meerschweinchen keine Spur von Tränenfluß oder von Fettsekretion nachzuweisen. (Näheres ist im Protokoll am Schlusse dieser Note nachzulesen.)

Noch andere Substanzen dieser Gruppe, die mir von Prof. *Contardi* überlassen wurden, konnten der Prüfung unterzogen werden, und zwar: Trimethylaminjodhydrat, Tetramethylammoniumjodid, Tetramethylammoniumformiat oder -benzoat stets bei einer Dosis von 0,01 g pro Kubikzentimeter[1]).

Trimethylaminjodhydrat, $HJ \, . \, N(CH_3)_3$, erzeugt beim Meerschweinchen, nach intravenöser Einspritzung von 1 ccm, reichlichen Tränenfluß, jedoch ohne jegliche Reizwirkung auf die *Harder*sche Drüse.

Tetramethylammoniumjodid, $J \, . \, N(CH_3)_4$, wirkt bei einer Dosis von 1 ccm sofort tödlich, wobei eine starke Hypersekretion sowohl der Tränendrüse als der *Harder*schen Drüse an den Tag tritt; eine identische Wirkung ist auch mit der Dose von ½ ccm = 0,005 g zu erreichen.

---

[1]) Exakter wäre es gewesen, gleichmolekulare Lösungen der verschiedenen Produkte anzuwenden; es ändert dieses jedenfalls aber in unserem Falle nichts an dem Werte der erhaltenen Resultate.

Tetramethylammoniumformiat, $HCOO . N(CH_3)_4$, ist für das Meerschweinchen bei Dosen von 0,20 ccm (= 0,01 g Substanz) und von 0,10 ccm (= 0,005 g) stark toxisch und bewirkt auch eine ausgesprochene Reizung mit Hypersekretion beider Drüsen.

Ein ebensolches Verhalten zeigt, wenn in gleichen Dosen angewendet, *Tetramethylammoniumbenzoat*, eine Substanz, welche, wie die vorausgehende, eine große therapeutische Verwendung gefunden hat und folgender Formel entspricht: $C_6H_5 . COO . N(CH_3)_4$.

Es sei an die chemisch wohl bekannte Tatsache erinnert, daß die ersteren zwei Substanzen (Trimethylammoniumsulfat und -jodhydrat) nach Behandlung mit Silberoxyd, neben dem entsprechenden Salz der verwendeten Base, Ammoniak, NH_3, oder bzw. Trimethylamin, $N(CH_3)_3$, während nach gleicher Behandlung die letzten drei Verbindungen Tetramethylammonium, $OH . N . (CH_4)_4$, neben Silberjodid, -formiat, bzw. -benzoat erzeugen.

Bei allen diesen Verbindungen ist wahrscheinlich die Gruppe Alkylammonium diejenige, welche als reizendes Hormon auf die Tränendrüse wirkt, und in manchen Fällen, namentlich beim Meerschweinchen, die Fettabsonderung der *Harder*schen Drüse anregt, sei es dank einer speziellen molekularen Struktur oder auch wegen einer besonderen Disposition der Drüse selbst.

Um wieder auf die *Ferri*sche Reaktion für Extrakte des *Agaricus muscarius* oder auf meine ihr entsprechende Reaktion dem Muscarin gegenüber zurückzukommen, so können wir dabei die Wirkung der Tetraalkylammoniumgruppe zuschreiben, die, wie wir wissen, in diesem Alkaloid vorkommt, in welchem, an Stelle eines Methyls, die Dioxyäthylgruppe enthalten ist: $OH . N(CH_3)_3[CH_2 . CH_2(OH)_2]_2$.

Das Naturmuscarin entfaltet, wie wir gesehen haben, eine spezifische Reizwirkung auf die *Harder*sche Drüse, während hingegen das synthetische Präparat, selbst bei Einführung 100facher Dosen, nur ganz schwach wirkt.

Das synthetische Muscarin, auch Cholinmuscarin genannt, weil es durch Oxydierung des Cholins mit Salpetersäure erhalten wird, ist seiner Formel nach als ein Stereoisomer des Muscarins aus *Agaricus* zu betrachten.

Der bedeutende Unterschied, welcher in der Wirkung der beiden einander chemisch so nahestehenden Produkte nachzuweisen ist, kann nun aber ausschließlich mit einer strukturellen Verschiedenheit in Zusammenhang stehen, für welche, wie wir aus der Biologie wissen, die Zellen außerordentlich empfindlich sind.

Dem synthetischen Muscarin steht, was die geringe Reizwirkung auf die *Harder*sche Drüse anbelangt, eine andere chemisch verwandte Substanz nahe, d. h. das Betain und dessen Chlorhydrat:

$$(CH_3)_3 . N{-}CH_2 . CO \quad (\text{N und CO über O verbunden})$$

Eine weitere in der Therapie viel gebrauchte Substanz, welche sich der uns beschäftigenden bezüglich ihrer lymphanregenden Tätigkeit nähert (jedoch mehr auf die Tränendrüse als auf jene des Auges), ist das Pilocarpin; wahrscheinlich beruht hierbei obiges Vermögen auf der Gegenwart der Tetraalkylammoniumgruppe in dessen Molekülen.

Es handelt sich (nach *Schmiedeberg* und *Hartnach*) um ein Betain, das an Stelle des Essigsäurerestes einen Propionsäurerest enthält, bei welchem sich in α-Stellung der Stickstoff mit dem Pyridinrest bindet.

```
            CH3                                   CH3
            |        CH                                      CH
CH3\        |       /  \            CH3\                    /  \
CH3 >N —— C — — C     CH            CH3—N —— C — — C       CH
CH3/ |      |       |    |   (1)    CH3/        |       ||    |    (2)
     |      |      HC    CH                     |  O   HC    CH
     O      C\      \  /                        C<        \  //
     .      | \O     N                            O ——————N- CH3
  (H       OH)
```

Ein gleiches wäre der Fall, wenn das Pilocarpin die in der Formel (2) angegebene Zusammensetzung hätte, da es sich auch hier um ein Derivat der Tetraalkylammoniumgruppe handeln würde.

Um nun wieder auf den Punkt zurückzukommen, von dem wir ausgingen, d. h. auf die aktivierende Wirkung des Aalserums der *Harder*schen Drüse gegenüber, so könnte man sich fragen, ob dieses für Versuchstiere so stark toxische Serum nicht etwa ein Derivat der Tetraalkylammoniumgruppe enthalte. Die Glieder dieser Gruppe besitzen in ausgesprochenem Maße das Vermögen, die Drüsensekretion zu fördern; diese Wirkung ist bei einigen mehr spezifisch als bei anderen, so daß z. B. das Pilokarpin den Speichelfluß und das Muscarin die Sekretion der *Harder*schen Drüse anregt.

Literatur.

a) Über die Hardersche Drüse.

Chauveau, Arloing, Lesbre, Anatomia comparata degli animali domestici. Ital. Edition, S. 794. Turin 1910. — *Ellenberger* und *Schuhmacher,* Hystologie der Haustiere, S. 344. — *Foltz,* Annales d'oculistique 1862. — *Fröhner,* Monatsschrift f. prakt. Tierheilk. 1893, S. 312. — *Löwenthal,* Anatom. Anz. **7**, 48; Arch. f. mikrosk. Anatomie **79**, 490; Anat. Anz. **49**, 13, 1916/17. — *Lutz,* Zeitschr. f. Tiermedizin 1899, S. 181. — *Miessner,* Arch. f. wissensch. u. prakt. Tierheilk. **26**. — *Mobilio,* Anat. Anz. **48**, 289. — *Moller,* Lehrb. d. Augenheilk. f. Tierärzte 1910, S. 361. — *Motais,* Anatomie de l'oeil de l'homme et des vertèbres. — *Mülon, Duboc,* Les secretions de la glande de *Harder* du lapin. — *Nicolas,* Ophthalmologie Vétérinaire **8**, 1908. — *Vaccheya,* Oftalmia veterinaria. Edit. Vallardi, Milano **1**. — *Zietschmann,* Handb. d. vergl. mikrosk. Anatomie f. Haustiere **1**, 535.

b) Über Cholin, Muscarin usw.

Vincent Cramer, Centralbl. d. Chem. **1903**, S. 1452. — *Desgrez,* C. r. Acad. des sciences **135**, 52. — *Chevalier Desgrez,* ebendaselbst **146**, 89. — *Gautrelet,* ebendaselbst **148**, 1908. — *Halliburton,* Proc. Roy. Soc. of Med. London **65**, 92. — *Kobert,* Lehrb. d. Intoxikationen **2**, 1224. — *Lohmann,* Centralbl. d. Chem. **1907**, 418. — *Modrokowski,* ebendaselbst **1908, II**, 1528. — *Piccinini,* Comunicazione al XXX. Congr. di Med. int. Milano, ottobre 1924.

Protokolle der Versuche.

Datum	Dosis ccm	Versuchstier Meerschweinchen g	Ausgang	Tränenfluß
		Aalserum (intravenös).		
25. I. 1923	0,25	400	† in 2 bis 3′	Nicht milchig
25. I.	0,50	450	† sofort	Ausgesprochen u. milchig
2. II.	0,25	500	† in 1′	" " "
2. II.	0,25	380	† in 1′	" " "
5. II.	0,50	470	† sofort	" " "
5. II.	0,25	350	† "	" " "
5. II.	0,10	330	† "	Kein
5. II.	0,05	350	† "	"
5. II.	0,025	380	† "	"
13. II.	0,50	630	† "	Ausgesprochen u. milchig
9. III.	0,50	490	† "	Spärlich
9. III.	0,30	380	† in 2′	"
12. I. 1925	0,25	370	† sofort	Kein
12. I.	0,50	420	† "	Ausgesprochen u. milchig

Datum	Lösung	Dosis ccm	Versuchstier Meerschweinchen g	Ausgang	Tränenfluß
			Naturmuscarin (intravenös).		
1924					
30. VI.	1 : 100	0,5	350	†	Ausgesprochen u. milchig
6. XI.	1 : 500	1	370	lebt	" " "
6. XI.	1 : 1000	1	400	"	" " "
6. XI.	1 : 5000	1	380	"	" " "
6. XI.	1 : 10000	1	350	"	Kein
6. XI.	1 : 10000	1	360	"	"
11. XI.	1 : 1000	1	300	"	Ausgesprochen u. milchig
11. XI.	1 : 1000	1	300 subkutan	"	Kein
11. XI.	1 : 100	0,5	300 "	"	Nicht milchig
1925					
27. I.	1 : 100	0,10	320	"	Spärlich u. milchig
27. I.	1 : 100	0,10	370	"	Ausgesprochen u. milchig
27. I.	1 : 1000	0,20	400	"	Spärlich u. milchig
27. I.	1 : 1000	0,20	400	"	Ausgesprochen u. milchig
27. I.	1 : 1000	0,10	350	"	Kein
27. I.	1 : 1000	0,10	340	"	Ausgesprochen u. milchig
			Synthetisches Muscarin (intravenös).		
1924					
6. XI.	1 : 500	1	340	lebt	Zweifelhaft
1925					
27. I.	1 : 100	0,5	400	"	Milchig
27. I.	1 : 100	1	500	† sofort	Nicht milchig
27. I.	1 : 100	0,10	320	lebt	Kein
27. I.	1 : 100	0,5	330	"	Milchig, spurenhaft
27. I.	1 : 100	0,25	330	"	" "
27. I.	1 : 100	0,20	400	"	" "
27. I.	1 : 100	0,10	360	"	Kein
27. I.	1 : 100	0,10	310	"	"
27. I.	1 : 100	0,10	360	"	"
27. I.	1 : 100	0,20	350	"	Ziemlich stark u. milchig

Datum	Lösung	Dosis ccm	Versuchstier g		Ausgang	Tränenfluß
		Pilocarpinchlorhydrat (intravenös).				
1924						
17. XI.	1 : 100	0,5	Meerschw.	350	lebt	Kein, nach 30' reichl. Speichelfluß
17. XI.	1 : 100	0,1	„	315	„	Kein
17. XI.	1 : 100	1 subk.	„	320	„	„
17. XI.	1 : 100	1 g	Kaninchen	1700	„	Milchig, sofort Speichelfl.
17. XI.	1 : 100	0,1 g	„	1750	„	Spärl. u. n. milchig. sof. Speichelfl.
		Tetramethylammoniumbenzoat.				
24. XI.	0,02 f. ccm	0,5	Meerschw.	350	† sofort	Milchig
24. XI.	0,02 „ „	0,25	„	300	† in 1'	„
24. XI.	0,02 „ „	0,10	„	315	† in 1'	Unsicher
24. XI.	0,02 „ „	0,25	„	330	lebt	Kein
24. XI.	0,02 „ „	0,01	„	310	„	„
		Tetramethylammoniumformiat.				
11. XII.		0,5	Meerschw.	340	† sofort	Reichlich u. milchig
11. XII.		0,25	„	330	† in 1'	Deutlich u. milchig
11. XII.		0,25	„	560	lebt	Spärlich, nicht milchig
11. XII.		0,20	„	420	† in 1'	Deutlich u. milchig
11. XII.		0,10	„	390	lebt	Nicht milchig
		Betainchlorhydrat (intravenös).				
12. XII.	1 : 100	0,50	Meerschw.	300	lebt	Kein
12. XII.	1 : 100	1	„	340	„	„
1925						
5. II.	1 : 100	1	„	400	„	„
5. II.	1 : 100	2	„	400	„	„
5. II.	1 : 100	2	„	490	„	„
		Betain (intravenös).				
1924						
12. XII.	1 : 100	1	Meerschw.	400	lebt	Kein
1925						
5. II.	1 : 100	2	„	390	„	„
5. II.	1 : 100	3	„	420	„	„
		Tetramethylammoniumjodid (intravenös).				
1924						
12. XII.	1 : 100	1	Meerschw.	380	† sofort	Ausgesprochen u. milchig
12. XII.	1 : 100	0,5	„	360	† in 2—3'	„ „ „
1925						
5. II.	1 : 100	0,5	„	440	† in 1'	„ „ „
5. II.	1 : 100	0,25	„	370	† in 1—2'	„ „ „
5. II.	1 : 100	0,10	„	490	lebt	„ „ „
		Trimethylammonium (intravenös).				
1924						
12. XII.	1 : 100	1	Meerschw.	400	lebt	Ausgesprochen u. milchig
1925						
5. II.	1 : 100	1	„	350	„	Reichlich
5. II.	1 : 100	1,5	„	450	„	Spärlich
5. II.	1 : 100	2	„	490	„	Sehr reichlich
		Ammoniumsulfat.				
1924						
12. XII.	1 : 100	1	Meerschw.	380	lebt	Kein
12. XII.	1 : 100	2	„	320	„	„
1925						
30. I.	1 : 10	1	„	550	† sofort	„
30. I.	1 : 10	1	„	570	† „	Leichter
30. I.	1 : 10	0,5	„	500	lebt	Kein

Das kolloidale Verhalten der Muskeleiweißkörper.

I. Mitteilung:

Isoelektrischer Punkt und Stabilitätsbedingungen des Myogens.

(Kurz mitgeteilt auf der 88. Naturforscherversammlung, September 1924.)

Von

Hans H. Weber (Rockefeller-Stipendiat).

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 25. März 1925.)

Mit 6 Abbildungen im Text.

Inhalt.

Allgemeiner Teil.

I. Kontraktionstheorien und physikochemische Eigenschaften der Muskeleiweißkörper.

Durch die grundlegenden Untersuchungen *Hills* und *Meyerhofs*[1]) ist die Energetik des Muskels weitgehend geklärt. Vorwiegend durch *Meyerhof*[1]) ist auch bekannt, welche physikochemischen Zustandsänderungen des Muskels die einzelnen Phasen seiner Energieproduktion

[1]) *A. V. Hill* und *O. Meyerhof*, Ergebn. d. Physiol. **22**, 299, 1923.

bedingen. Nicht geklärt ist dagegen, durch welchen Mechanismus der Muskel einen Teil dieser Energie in mechanische Spannung umsetzt. Der in Bruchteilen einer Sekunde von der Erschlaffung abgelöste Kontraktionsvorgang ist einer direkten physikochemischen Untersuchung nicht zugänglich. Für sein Verständnis ist man auf Kombination angewiesen. Ihr hat als Unterlage eine systematische Kenntnis nicht nur der energetischen Vorgänge zu dienen, sondern auch des physikochemischen Verhaltens der Muskelgrundsubstanz, in erster Linie der Muskeleiweißkörper. Zu solcher Kenntnis beizutragen, ist der Zweck der vorliegenden Untersuchungen.

Über dieses physikochemische Verhalten machen die bestehenden Kontraktionstheorien bestimmte Voraussetzungen. Die Säurequellungshypothese geht von der Annahme aus, daß die durch Milchsäurebildung erhöhte H-Ionenkonzentration eine Säurequellung der Muskeleiweißkörper und dadurch eine Kontraktion veranlaßt. Dies hätte zur Voraussetzung, daß die auftretenden H-Ionen die Reaktion über den isoelektrischen Punkt der Verkürzungssubstanz hinaus nach der sauren Seite verschieben. Der direkte Beweis hierfür fehlt.

Fürth[1]) nimmt ein einem indirekten Beweis an, daß der Kontraktionsmechanismus bei der Starre derselbe sei, wie bei der Vitalkontraktion. Die Starre sieht *Fürth* aber aus folgendem Grunde als Quellung an: Während ihres Verlaufs nimmt der Muskel Wasser auf und zwar selbst aus außerordentlich hypertonischen Lösungen (25 Proz. NaCl). Auch bei postmortalem Zerfall aller hochmolekularen Substanzen des Muskels kann der osmotische Druck im Muskelinnern nicht so hoch werden, daß er derartige Außendrucke überwinden kann; also ist diese Wasseraufnahme nach *Fürth* bedingt durch „Kräfte höherer Größenordnung", durch Quellungskräfte. Dieser einzige Beweis einer Säurequellung ist nicht stichhaltig.

Die ganze Gewichtskurve des Muskels in Bädern läßt sich rein osmotisch verstehen. *Winterstein*[2]) und *Weber*[3]) haben gezeigt, daß die Permeabilität des Muskels post mortem dauernd zunimmt, er wird zunächst für Kristalloide, dann für Kolloide durchgängig. Sobald er für Kristalloide durchgängig ist, üben nur noch *hochmolekulare* Substanzen einen osmotischen Druck auf die Muskelmembranen aus; solche Substanzen befinden sich aber allein im Muskelinnern. Sie veranlassen also eine — rein osmotisch verständliche — Wasseraufnahme, da auch die höchstkonzentrierte kristalloide Außenlösung gegenüber

[1]) *O. v. Fürth*, Ergebn. d. Physiol. **17**, 363 und 408, 1919.
[2]) *H. Winterstein*, diese Zeitschr. **75**, 48, 1916.
[3]) *H. H. Weber*, Pflügers Arch. **184**, 165; **191**, 186, 1921.

dem sterbenden Muskel zu diesem Zeitpunkt den osmotischen Druck Null hat[1]).

Dieselben Überlegungen gelten für alle bisherigen Versuche, aus der Imbibition des Muskels etwas über seine Säurequellung zu erschließen, z. B. auch für die, die *ich* selbst[2]) früher zu diesem Zweck osmometrisch angestellt habe.

Hill[3]) und *Meyerhof*[3]) haben demgegenüber in jüngster Zeit vorgeschlagen, einen Entquellungs-, d. h. Entionisierungsprozeß des Eiweißes in den Mittelpunkt der Erörterung über das Wesen der Kontraktion zu stellen. Er würde zustande kommen nach der Formel: Alkalieiweiß (ionisiert) + Milchsäure ⟶ Eiweiß- (entionisiert) + Alkalilactat. Diese Reaktion bildet tatsächlich, wie *Meyerhof*[4]) thermodynamisch bewiesen, zum mindesten äußerst wahrscheinlich gemacht hat, das Ergebnis der Milchsäureanhäufung an den Erschlaffungs- oder Ermüdungsorten. Ob sie vorher ebenso an den Verkürzungsorten verläuft, ist unbewiesen.

Ein erstes Urteil über die Wahrscheinlichkeit der einen oder anderen der beiden skizzierten Theorien läßt sich gewinnen, wenn man den p_H des isoelektrischen Punktes der Verkürzungssubstanz mit dem p_H vergleicht, der durch Milchsäurebildung an den Kontraktionsorten entsteht. Der isoelektrische Punkt der Verkürzungssubstanz müßte für die Säurequellungshypothese in der Gegend des Ruhe-p_H liegen. Die Entquellungstheorie verlangt ihn dagegen möglichst nahe am Kontraktions-p_H.

Der Kontraktions-p_H dürfte auch bei der Vitalkontraktion *Meyerhofs* Selbststeuerungs-p_H[5]) nicht überschreiten, da dieser wenigstens postmortal jede Milchsäurebildung unterdrückt; zweifelhafter ist es natürlich, ob er ihn jedesmal erreicht. Der Selbststeuerungs-p_H dürfte sich im Gegensatz zu manchen Literaturangaben[6]) nach orientierenden Versuchen am Preßsaft zwischen p_H 6 und 5,5 befinden.

Man hat also nicht mit einer Säuerung der Verkürzungsorte wesentlich über p_H 6 hinaus zu rechnen. Darum hat *Meyerhof*[3]) die Voraussetzungen seiner Anschauung des Kontraktionsvorgangs folgendermaßen formuliert: Der isoelektrische Punkt der Verkürzungssubstanz

---

[1]) Die Permeabilitätsverhältnisse des Muskels sind in diesem Stadium seiner Auflösung die gleichen, die an den Kapillaren den physiologischen Normalzustand bedeuten; aus ihnen haben *Krogh* und andere zwanglos die Ödembildung erklärt, für die man ja auch eine „Säurequellung" beansprucht hat. *S. A. Krogh*, Anat. u. Physiol. d. Kapillaren. Berlin, Julius Springer, 1924.

[2]) *H. H. Weber*, Pflügers Arch. **184**, 165; **191**, 186, 1921.

[3]) Z. B. Naturwissenschaften, 12. Jahrg., 1924, S. 1137.

[4]) *O. Meyerhof*, Pflügers Arch. **195**, 22, 1922.

[5]) *Derselbe*, ebendaselbst **188**, **114**, **1921.**

[6]) *H. Pechstein*, diese Zeitschr. **68**, 151, 1915.

liegt bei p_H 6, der isoelektrische Punkt der Ermüdungssubstanz ist wesentlich saurer (p_H 4,7 bis 5), da deren Eiweißalkali die Milchsäure von den Verkürzungsorten hinwegzubinden hat.

Die Untersuchungen über den isoelektrischen Punkt der Muskeleiweißkörper stammen durchweg aus jüngster Zeit. Sie sind wenig zahlreich. Jede gibt andere Lagen des isoelektrischen Punktes der Muskeleiweißkörper an: Nach *Wöhlisch*[1]) liegen sie für Kaninchen, Frosch und Fisch zwischen p_H 4,2 und 5,0 für Myogen und Myosin, für einen weiteren Eiweißkörper bei 3,4 (Methodik nicht angegeben). *Collip*[2]) findet den isoelektrischen Punkt des Froschmuskeleiweißes bei p_H 6,3 (erschlossen aus dem Fällungsoptimum). *Vlès* und *Coulon*[3]) geben einen Umschlagspunkt der elektrischen Wanderung im Muskel von Mäusen zwischen p_H 6 und 7, einen bei p_H saurer als 5, einen bei p_H 9 bis 10 an. Nach *Granström*[4]) liegt der isoelektrische Punkt (= Fällungsoptimum) des Kaninchenmyosins bei p_H 4, nach *Quagliariello*[5]) bei p_H 4,5 bis 5,0 (= Quellungsoptimum), ebenda auch der des Myogens (Fällungsoptimum) und des Gesamtmuskels. Mit besonderer Rücksicht auf die Frage der Kontraktion wurde die Untersuchung von *Quagliariello* unternommen. Ihr Ergebnis würde die Säurequellungshypothese unmöglich erscheinen lassen, wäre aber auch bei der gleichmäßigen und sauren Lage sämtlicher isoelektrischen Punkte des Muskels den von *Hill* und *Meyerhof*[6]) vorgeschlagenen Ansichten ungünstig.

Die folgende Untersuchung stellt im Rahmen einer sonst qualitativen Charakterisierung der Muskeleiweißkörper auch die Lage ihrer isoelektrischen Punkte fest. Einige der zitierten Literaturangaben werden dabei ihrem Zustandekommen nach verständlich.

Zur Terminologie muß bemerkt werden: Abweichend vom Gebrauch vieler Autoren, die die Eiweißkörper als lyophil den anorganischen lyophoben Kolloiden gegenüberstellen, werden im folgenden die Eiweißkörper als lyophob bezeichnet, die mit den anorganischen Kolloiden die Instabilität bei Entladung unter ein kritisches Potential gemeinsam haben[7]). Lyophil sind demnach die Eiweißkörper, die selbst bei dem Potential 0, am isoelektrischen Punkt, durch ihre Affinität zum Wasser in Lösung bleiben.

---

[1]) *E. Wöhlich*, Verhandl. d. Phys.-Med. Gesellschaft zu Würzburg. N. F., **50**, Heft 1, 1925.

[2]) *J. B. Collip*, Journ. of biol. Chem. **50**, 1922.

[3]) *F. Vlès* et *A. de Coulon*, C. r. hebdom. des séances de l'acad. des sciences **179**, 82, 1924; Berichte **29**, 26.

[4]) *K. O. Granström*, diese Zeitschr. **134**, 589, 1923.

[5]) *G. Quagliariello*, Arch. di Science Biol. **5**, 443, 1924.

[6]) *O. Meyerhof*, Naturwissenschaften, Heft 50, 1924, S. 1137.

[7]) Ähnlich gebraucht *Freundlich* den Ausdruck „lyophob" beim hitzedenaturierten Albumin (Kapillarchemie, 3. Aufl. S. 836; Leipzig 1923).

II. Isoelektrischer Punkt und osmotisches Druckminimum des Myogens.

In seiner ausgezeichneten Untersuchung über die Muskeleiweißkörper charakterisiert *Fürth*[1]) das Myogen als lyophilen, d. h. dialysebeständigen, bei jeder Reaktion löslichen Eiweißkörper von goldgelber Farbe[2]), der bei raschem Erwärmen erst über 50 Proz. oder durch hohe Ammonsulfatkonzentrationen flockt (über seine Darstellung s. Experimenteller Teil I, B).

Die einzige definitionsgemäße und damit direkte Weise, den isoelektrischen Punkt zu ermitteln, d. h. den Punkt, an dem das Eiweiß keine überwiegend positive oder negative Ladung trägt, ist die Methode der elektrischen Überführung. Sie ist immer dann maßgebend, wenn eine der indirekten Methoden im Ergebnis prinzipiell nicht mit ihr übereinstimmt. Solche indirekten Methoden sind Bestimmung des Minimums des osmotischen Drucks, der Quellung, der Viskosität, des Maximums der Instabilität.

Quellungs- und Fällungsversuche sind an der lyophilen Myogenlösung ohne vorherigen denaturierenden Eingriff nicht möglich. Sie werden gesondert besprochen (s. in diesem Kapitel III bis V), Viskositätsmessungen fallen unregelmäßig aus, da in der Kapillare des Viskosimeters sich Fibrinfäden bilden.

So bleibt allein die Messung des osmotischen Druckes und der elektrischen Wanderung.

Die Kataphorese wurde im Überführungsapparat von *Michaelis* für quantitative Bestimmung der Wanderungsgeschwindigkeit vorgenommen. Die Versuche wurden nicht quantitativ ausgewertet, da erst zuletzt ein passendes Voltmeter zur Verfügung stand (Einzelheiten s. im Experimentellen Teil I, C und II, A und B). Die Größe des Ausschlags ergibt sich aus der Verschiebung der Gelbfärbung. Qualitativ wurde die Wanderungsrichtung durch Eiweißfällung in den Seitenteilen des Überführungsapparats kontrolliert. Gewertet wurden nur Versuche, bei denen der p_H des Mittelgefäßes konstant blieb und der p_H der Seitengefäße auch am Schlusse nicht mehr als 0,15 davon abwich.

So ergibt sich beim Kaninchen eine isoelektrische Zone von p_H 6,2 bis 6,4; von 6,1 an deutliche kathodische, von 6,5 an anodische Wanderung. Also liegt der isoelektrische Punkt des Kaninchenmyogens bei p_H 6,3. Die Versuche fallen gleich aus in m/30, m/60 und m/120 Phosphat und m/120 Acetat. Dies gilt für das unveränderte gelbe lyophile Myogen. Von Trübungen, die besonders bei Zusatz der höher konzentrierten Phosphate zu konzentrierter Myogenlösung zwischen p_H 6 und 5 entstehen, muß abfiltriert werden. Die weitgehende Unabhängigkeit des isoelektrischen Punktes des genuinen Myogens von

[1]) *O. v. Fürth*, Arch. f. d. exper. Pathol. u. Pharm. **36**, 231, 1895.

[2]) Ob diese Gelbfärbung dem Myogen selbst oder einer adsorbierten Verunreinigung angehört, ist fraglich. Sie ist jedenfalls nicht durch Äther-Alkoholwaschung zu beseitigen und wandert auch im elektrischen Feld immer zusammen mit dem Eiweiß.

anderen Ionen als H˙ und OH′ ist bemerkenswert, weil die Stabilität dieses Eiweißkörpers mindestens von den Anionen sehr auffällig abhängig ist (s. darüber besonders Nr. III dieses Kapitels). (Belege s. Experimenteller Teil II A.)

Die Wanderungsgeschwindigkeit scheint auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes schneller als auf der alkalischen anzusteigen, ebenso auch der osmotische Druck (s. Abb. 1). Auch sein Minimum liegt zwischen p_H 6 und 6,5 (s. Experimenteller Teil II, C).

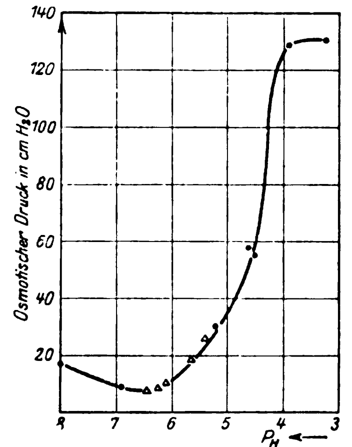


Abb. 1. Der osmotische Druck von Kaninchenmyogen gegen Essigsäure — NaOH.
—·—·—· Versuch Nr. 1; Δ—Δ—Δ Versuch Nr. 2 (s. exper. Teil, II, C).

Der Grad der in der Abbildung dargestellten osmotischen Druckzunahme hat keinerlei absolute Bedeutung, da er nicht nur von der Eiweiß und H˙-Konzentration, sondern von dem *Donnan*-Gleichgewicht sämtlicher Fremdelektrolyte abhängt. Ihre Art und Konzentration war aber nicht genau bekannt, da das verwendete Myogen von vornherein nicht restlos salzfrei war. So kann man von vorliegenden Experimenten aus auch nicht zu absoluten Daten etwa über die Säure- oder Basenbindung des Myogens gelangen, besonders, da es unbekannt ist, welchen Dispersitätsgrad das Myogen hat. Auch bei genauer Kenntnis des *Donnan*gleichgewichts kann man derartige Berechnungen korrekt nur an molekular, nicht an mizellar verteiltem Eiweiß machen[1]).

Der für das Kaninchen ermittelte isoelektrische Punkt des Myogens gestattet eine Diskussion beider im ersten Kapitel zitierten Kontraktionstheorien. Er entspricht fast genau der von *Meyerhof* geforderten Lage des isoelektrischen Punktes seiner Verkürzungssubstanz. Für die Säurequellung bleibt ein p_H-Intervall von 6,3 bis etwa 5,8 (d. h. isoelektrischer Punkt bis ungefähre Lage des Selbststeuerungs-p_H). Von dem Ruhe-p_H (etwa bei p_H 7,1 bis 7,2) würde das Myogen zunächst bis 6,3 entquellen. Es ist fraglich und muß durch quantitative Messungen entschieden werden, ob die in Betracht kommende Säureionisation überhaupt wesentlich höher ist als die Alkaliionisation des Ruhe-p_H.

Bei Rana esculenta scheint der isoelektrische Punkt des Myogens etwas saurer, bei p_H 6 zu liegen. Die Differenz gegenüber dem Kaninchen 6,0 und 6,3 ist nicht groß, liegt aber außerhalb der Fehlergrenzen der eigentlichen Methodik. Aus bestimmten Gründen ist aber bei Esculenta

[1]) Siehe dazu: *Jaques Loeb*, Die Eiweißkörper und die Theorie der kolloidalen Erscheinungen, besonders S. 245 und 246. Berlin, Julius Springer, 1924.

die Darstellung des Myogens schwieriger, so daß ein Gehalt an anderen Eiweißkörpern den Unterschied bedingen könnte (Myosin). Die Frage wird bei der quantitativen Potentialuntersuchung des Myogens entschieden werden. Sollte der fragliche Befund richtig sein, müßte er vorläufig gegen die Säurequellungstheorie angeführt werden (Belege s. Experimenteller Teil II, B).

Der isoelektrische Punkt des Myogens kommt in seiner Lage dem am nächsten, was die zitierten Kontraktionstheorien von ihrer Verkürzungssubstanz fordern bzw. fordern müssen. Ob das Myogen wirklich die Verkürzungssubstanz ist, ist nicht bekannt.

III. Fällung und Umladung durch Anionen.

Zu einem gewissen Teil kann das lyophile Myogen auch bei niederer Temperatur (10 bis 20°) unter Denaturierung fast momentan flocken. Dazu bedarf es am isoelektrischen Punkt und auf seiner alkalischen Seite der Anwesenheit von Schwermetallionen gleichzeitig mit anderen Salzen oder aber des „Zusammenwirkens von Salz und Säure" [*Fürth*[1])]. Letzteres heißt mit anderen Worten: Salze bewirken bei saurer Reaktion eine mehr oder minder umfangreiche Fällung, sie beginnt zwischen p_H 6 und 5 und erstreckt sich nach der sauren Seite. Sie ist von methodischer Bedeutung, da sie im Prinzip bei jedem Salz auftritt und so leicht zu Fehlschlüssen bei der Charakterisierung der Muskeleiweißkörper führen kann (z. B. *Quagliariello*, s. u.). Da sie ferner von einem gewissen kolloidchemischen Interesse ist, wird sie etwas eingehender behandelt.

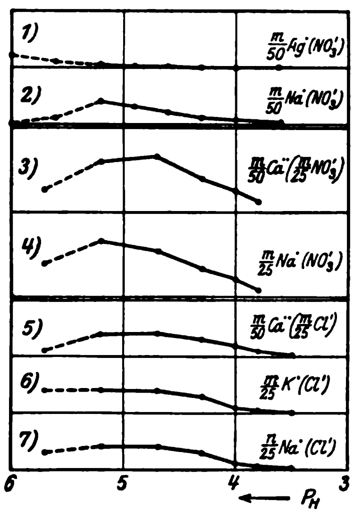


Abb. 2. Kationeneinfluß auf die Myogenfällung zwischen p_H 6 und 3. Ordinate: Fällungsgröße in willkürlichen Einheiten. Die angegebenen Salze befinden sich für 1 und 2 in m/100, 3—7 in m/50 Acetat zur Fixierung des p_H. Nur die durch gemeinsamen Rahmen zusammengefaßten Kurven sind untereinander vergleichbar. (S. ferner exper. Teil, II, D.)

Weil es sich um einen Vorgang auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes handelt, war zu erwarten [*Jaques Loeb*[2]), *Michaelis*[3])], daß die Elektrolytwirkung im wesentlichen eine Funktion der zugesetzten Anionen sei. Dies wird durch

[1]) a. a. O., S. 246.
[2]) a. a. O.
[3]) *L. Michaelis*, diese Zeitschr. **103**, 240. 1920.

Abb. 2 bestätigt. Die Fällungskurven für verschiedene Kationen zusammen mit demselben Anion verlaufen von p_H 5,2 nach der sauren Seite identisch. Ein Kationeneinfluß macht sich also erst in der Gegend des isoelektrischen Punktes geltend. Eine Ausnahme machen die Schwermetalle, die die Denaturierung in dem fraglichen p_H-Intervall ganz aufheben.

Bei einem p_H von 5,2 und kleiner hängt die Fällungsgröße — abgesehen vom Einfluß der Schwermetalle — nur ab von der Konzentration und der spezifischen chemischen Natur des Anions, nicht von seiner Valenz. Dies illustriert Abb. 3 für die Na-(und ein $K^{\cdot}$-)Salze verschiedener Anionen an fünfmal verdünntem Kaninchenmyogen.

Der von *Jaques Loeb*[1]) ausgesprochene Verdacht, viele der „spezifischen Ionenwirkungen" beruhten in Wirklichkeit auf einer Verschiebung des p_H durch das betreffende Salz, trifft hier nicht zu. Die in Abb. 4 als Abszisse eingezeichneten p_H-Werte beruhen auf Kontrollmessungen am Schlusse des Versuchs.

Den Kurven sind die Fällungswerte nicht unter 2 Stunden nach Herstellung der Salzeiweißmischung zugrunde gelegt, vorher wandert das Fällungsmaximum mehr oder minder auf den Neutralpunkt zu, da die Fällung in den sauren Röhrchen (p_H 4 bis 4,5) rascher verläuft und früher stillsteht als in den weniger sauren. Der Umfang der Fällung wurde schätzungsweise verglichen, indem die stärker geflockten Röhrchen auf den Trübungsgrad der schwächeren mit Aqua dest. verdünnt wurden. Eine Trübung gilt als dreimal so stark wie eine zweite, wenn dies durch Verdünnen der ersten auf das dreifache Volumen erreicht ist. Die Methode ist natürlich ungenau, sie ist möglich, weil die Fällung auch bei der Verdünnung der wirksamen Anionenkonzentration nach einiger Zeit nur sehr langsam und unvollkommen reversibel ist (s. unten).

Außer mit der Konzentration der Anionen steigt die absolute Größe der Fällung auch mit der des Myogens. Selbst in der mäßig konzentrierten Myogenlösung der abgebildeten Versuche verursacht noch das am wenigsten wirksame Anion, das Acetat, in m/33 (m/50 + m/100) Konzentration eine deutliche Trübung. Die Anionen ordnen sich in der Reihe: $\text{Acetat}' < \text{Cl}' = \text{Lactat}' < H_2PO_4' < NO_3' < \frac{SO_4''}{2} < SCN' \ll \frac{\text{Sulfosalicylat}''}{2}$. Die Unterschiede der schwach fällenden Ionen prägen sich bei Verwendung höherer Konzentrationen als in Abb. 3 stärker aus[2]). *In dem Maße, wie die fällende Kraft der Anionen steigt* — mit der Vergrößerung entweder ihrer spezifischen Wirksamkeit

[1]) a. a. O.

[2]) Grade diese Reihe wurde zur Abbildung ausgewählt, um auch die stark wirksamen Ionen in ihrer Fällungskraft mit den anderen vergleichen zu können. Bei höheren Konzentrationen der Komponenten lassen diese aber die ganze Lösung zu einer trüben Gallerte erstarren.

oder ihrer Konzentration —, *wird nicht nur die Fällung im ganzen verstärkt*, sondern auch das *Maximum* der Flockung nach *der sauren Seite* verschoben (außer für NO_3' und SCN')[1].

Auch mit den Anfangsgliedern kann man in genügend hoher Konzentration fast völlige Myogenfällung erzielen; so bleibt z. B. bei Sättigung mit NaCl (etwa 4 m) bei etwa p_H 4 kaum mehr Eiweiß in Lösung.

Für die Verschiebung des Flockungsoptimums auf die saure Seite des isoelektrischen Punktes hat *Michaelis*[2]) am Casein genau dieselbe Anionenreihe gefunden. Beide Reihen decken sich in der Folge aller Glieder, die beiden Untersuchungen gemeinsam sind. Es scheint sich also um eine Reihe von allgemeiner Bedeutung für Eiweißkörper zu handeln. Von der *Hofmeister*schen Reihe unterscheidet sie sich grundlegend, z. B. durch die gegensätzliche Stellung von Acetat' und $\frac{SO_4''}{2}$ und die Nachbarstellung von $\frac{SO_4''}{2}$ und SCN'.

Diese „Anionenfällung" des Myogens läßt die Angabe *Quagliariellos*[3]) verstehen, der isoelektrische Punkt dieses Proteins liege bei p_H 5. Er hat ihn als Fällungsoptimum in Acetat bestimmt. Die Bestimmung ist richtig, aber das Fällungsoptimum ist außer in extrem verdünnten Elektrolytlösungen nicht mit seinem isoelektrischen Punkt identisch.

Über den Mechanismus dieser Flockung geben folgende Befunde wenigstens einen gewissen Aufschluß: Das durch Anionen denaturierte Myogen — aber nur dieses, nicht der gelöst bleibende

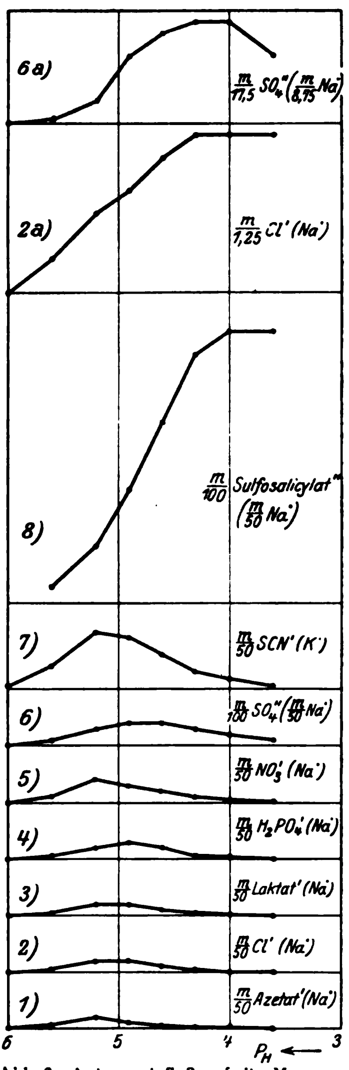


Abb. 3. Anioneneinfluß auf die Myogenfällung; Erklärung s. Abb. 2. Die angegebenen Salze befinden sich in m/100 Acetat. Alle Kurven sind vergleichbar. (S. ferner exper. Teil, II, D.)

[1]) Da auch diese Form des Myogenfibrins elektrisch geladen ist, bleibt es offen, ob die optisch festgestellte stärkere Fällung bei saurem p_H nicht in Wirklichkeit zum Teil eine stärkere Quellung ist.

[2]) *L. Michaelis* und *A. v. Szent-Györgyi*, diese Zeitschr. **103**, 178, 1920.

[3]) a. a. O.

Teil (s. II dieser Mitteilung) — wird in seiner elektrischen Ladung geändert; sein isoelektrischer Punkt wandert um etwa eine Zehnerpotenz oder mehr nach der sauren Seite. Er liegt bei Gegenwart von m/50 Acetat, Cl, Lactat, Phosphat, Nitrat (in m/100 Acetat zur Fixierung des p_H) bei 5,4 bis 5,5, in m/200 SO_4'' bei 5,15, in m/50 SO_4'' bei 4,9 bis 5,0 (s. Experimenteller Teil II, E).

Diese Ladungsänderung tritt dagegen nicht ein, wenn die Anionen gemeinsam mit einem Schwermetall als Kation auftreten. Die dort nur auf der alkalischen Seite von p_H 5,5 (s. Abb. 2, Kurve 1) auftretende Trübung wandert noch an der Untersuchungsgrenze bei p_H 6 kräftig kathodisch.

Stärkere Anionenwirkung verschiebt also gegenüber schwächerer den isoelektrischen Punkt des Denaturierungsproduktes weiter nach der sauren Seite. Der Betrag ist aber geringer als die entsprechende Verschiebung des Fällungsmaximums. Da aber, wie oben gesagt, der *Hauptunterschied* der *Anionenwirksamkeit* auch nicht in der Verschiebung des Fällungsmaximums, sondern in der *Verstärkung* seiner *absoluten Größe* besteht, so kann man zusammenfassend formulieren: *Wirksame Ionen laden bedeutend mehr Eiweiß unter Denaturierung um, aber sie ändern den Grad der Umladung nicht in entsprechendem Maße.*

Diese *Verlagerung des isoelektrischen Punktes* ist *restlos reversibel*. Wäscht man aus einem Myogenfibrin, das z. B. bei p_H 4 mit m/10 SO_4'' gefällt ist, das SO_4'' aus und bringt es in stark verdünnte Puffergemische mit wenig wirksamem Anion, so schlägt seine elektrische Wanderung wieder bei p_H 6,3 um, wie die des Myogens. Infolgedessen nimmt auch die Quellung von p_H 6 an nach der sauren Seite wieder deutlich zu. Dies zeigt Abb. 4, Kurve 1.

Die Quellung ist nicht sehr beträchtlich, sie ist auf der alkalischen Seite in der Nähe des isoelektrischen Punktes überhaupt nicht meßbar, da das Myogenfibrin infolge der langen Vorbehandlung weniger reaktionsfähig wird.

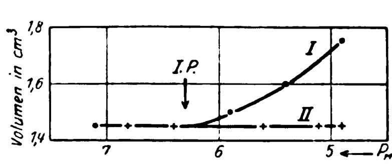


Abb. 4 Quellungskurven von Myogenfibrin (gefällt mit m/10 Na_2SO_4 bei p_H 4,1) nach Auswaschen des Na_2SO_4. Kurve I in m/100 Phosphat-Acetat, Kurve II ebenso + 5 Proz. NH_4Cl. (S. dazu exper. Teil, II, E, 3). I. P. = isoelektr. Punkt.

Bringt man die m/100 Pufferlösung der Versuche, die der Kurve 1 zugrunde liegen, durch Zusatz von NH_4Cl auf einen NH_4-Gehalt von 5 Proz., so verschwindet jede Quellungszunahme innerhalb der untersuchten d_H-Breite infolge der depressorischen Wirkung einer so hohen Salzkonzentration (etwa 1 m). Es tritt ferner keine spezifische Beeinflussung der Kohäsionskräfte, mit anderen Worten, der Löslichkeit ein, die sich in irgend einer Volumenänderung ausdrückt. Dies bleibt so, wenn man das

zusammenzentrifugierte Eiweiß noch einmal zu einer milchigen Suspension durchreibt und durchschüttelt, dann 12 Stunden stehen läßt und zum Schluß noch einmal zentrifugiert. Auch die überstehende Lösung ist nach dieser Zeit immer noch so eiweißfrei, wie in m/100 Puffern nur am isoelektrischen Punkt. (s. Experimenteller Teil II, E, 4). Daß 5 Proz. NH_4Cl demnach keine lösende Kraft für das Myogenfibrin hat, ist von methodischer Bedeutung, da es das am Muskel meist gebrauchte Extraktionsmittel ist. Beim Myosin liegen die Verhältnisse anders (vgl. zweite Mitteilung, Abb. 3 und 4).

Auch die *Eiweiß*fällung durch die Anionen ist nicht vollkommen irreversibel. Mit der Entfernung des wirksamen SO_4 gehen bei p_H 4 nicht ganz unbeträchtliche Eiweißmengen in Lösung. Um dies zu vermeiden, muß man die Acidität parallel der SO_4-Auswaschung nach p_H 6,3 hin abstumpfen.

Die Verlagerung und Rückverlagerung des isoelektrischen Punktes erfolgt in sehr kurzer Zeit. In m/200 SO_4'' wandert das ausflockende Myogenfibrin bei p_H 5,1 kathodisch, durch einige Tropfen konzentriertes $(Na_2^{\cdot})SO_4''$ auf m/50 gebracht, wandert es sofort anodisch. Verdünnt man die Lösung nun wieder durch SO_4-freies Myogen von p_H 5,1 ceteris paribus auf SO_4'' m/200, so ist die Wanderungsrichtung sofort wieder kathodisch[1]) (s. Experimenteller Teil II, E, 3).

Diese Tatsachen zeigen, daß die Anionen durch eine Bindung an das Myogen wirksam werden. Die Verlagerung des isoelektrischen Punktes des geflockten Anteils ist nichts anderes als eine gewisse elektrische Negativierung durch die elektronegativen Anionen. Der Gedanke, es könne sich einfach darum handeln, daß das Denaturierungsprodukt infolge innerer Konstitutionsänderungen einen anderen isoelektrischen Punkt hat als das genuine Myogen (wie das beim Serumalbumin der Fall ist), wird durch die völlige und schnelle Reversibilität der Ladungsänderung widerlegt.

Die Verknüpfung von Flockung und Ladungsänderung des flockenden Eiweißes ist hier qualitativ dem ähnlich, was *Jaques Loeb* gefunden hat bei der Untersuchung spezifischer Ionenwirkungen auf Stabilität und kataphoretisches Potential von Proteinen[2]). Der isoelektrische Punkt — also das Potential 0 — liegt für den flockenden Anteil in der Flockungszone. Ob die Flockungsgrenze gerade einem bestimmten Potential entspricht, wie dieser Autor gefunden hat, wurde nicht untersucht.

---

[1]) Der Versuch dauert bei Anwendung der mikroskopischen Überführungsmethode (*Michaelis*, Praktikum d. physikal. Chem. Berlin, Springer 1922) mit Konzentration und Verdünnung des Na_2SO_4 nur wenige Minuten.

[2]) a. a. O., S. 247ff.

Der Vorgang hier liegt aber auf jeden Fall komplizierter als in den von *Loeb* untersuchten Fällen. Dort *flocken nur lyophobe* Suspensionen, und zwar bei *jeder Verminderung* ihres Potentials unter einen kritischen Wert *auch bei einer solchen durch* $H^{\cdot}$ *und* OH', *während lyophile* Suspensionen bei *jeder Form* der *elektrischen Entladung stabil* bleiben. Hier dagegen wirken *Säurerest*anionen *fällend* auf ein *lyophiles* Material, das selbst *bei völliger Aufhebung* seines *Potentials* durch $H^{\cdot}$ *oder* OH' an seinem isoelektrischen Punkt *klar gelöst bleibt.*

Michaelis[1]) hat im Anschluß an ähnliche Beobachtungen von spezifischen Ionenwirkungen auf die Stabilität bzw. Löslichkeit von Proteinen vorgeschlagen, diese zu erklären durch größere oder geringere Wasserlöslichkeit von sich bildenden undissoziierten Eiweißanion- und Eiweißkationverbindungen. Es würde sich hierbei um undissoziierte Verbindungen im Sinne der klassischen theoretischen Chemie handeln, die dem Massenwirkungsgesetz folgen, z. B.

$$\frac{\text{Eiweiß}^{\cdot} \,.\, \text{Anion}'}{\text{Eiweißanion}} = K_{\text{Eiweißsalz.}}$$

Sieht man die undissoziierte Eiweißanionverbindung in unserem Falle als wenig wasserlöslich an, so wäre die Fällung befriedigend erklärt. Dann aber bleibt die Umladung unverständlich, da *Michaelis*[1]) auf Grund massentheoretischer Erwägungen postuliert hat, die Bildung undissoziierter Salze eines Ampholyten dürfe nicht zu einer Verlagerung seines isoelektrischen Punktes führen.

Dagegen könnte folgende Annahme die gefundenen Anionenwirkungen erklären: Es bildet sich ein nicht oder nur wenig lösliches, d. h. lyophobes Eiweißanionsalz — im Sinne von *Michaelis* —, das zu seiner Flockung nur noch der Entladung unter ein kritisches Potential bedarf. Diese kommt analog den *Loeb*schen Befunden auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes durch Adsorption weiterer Anionen zustande; die zur Entladung nötige Negativierung wird dagegen verhindert, wenn statt dessen mehr Kationen angelagert werden, was bei Gegenwart der gut adsorbierbaren Schwermetalle geschieht. In diesem Falle fehlt die Flockung. Ein *strenger* Beweis für die Richtigkeit dieser Erklärung ist bisher nicht geführt worden.

Biologisch legt die Empfindlichkeit des Myogens gegen Salze den Gedanken nahe, sie mit der Beeinflußbarkeit der Aktion und der elektrischen Verhältnisse des Gesamtmuskels [*Schwarz*[2]), *Höber*[3])] in Verbindung zu bringen. Es könnte sich hierbei um direkte Wirkungen

[1]) *L. Michaelis*, diese Zeitschr. **103**, 225, 1920.

[2]) *C. Schwarz*, Pflügers Arch. **117**, 161, 1907.

[3]) *R. Höber*, Physikal. Chem. d. Zelle u. Gewebe, 5. Aufl., 2. Hälfte, S. 632ff., besonders S. 637. Leipzig 1924.

eines veränderten Kolloidzustandes im Muskel handeln, wie dies *Höber* vertreten hat, oder auch um eine Beeinflussung der Lactacidogenspaltung im Sinne *Embdens*[1]) durch ein Begleitkolloid — eben das Myogen.

Über die Wahrscheinlichkeit dieser Annahme ist erst dann etwas auszusagen, wenn bekannt ist, ob die Ionen sich in der Reihenfolge ihrer Wirkung auf das Myogen bei physiologischem p_H ebenso anordnen, wie bei der Beeinflussung des Gesamtmuskels. In dem bisher untersuchten p_H-Intervall ist das nicht so. Derartige Experimente wurden nicht angestellt, da es zunächst auf die systematische Charakterisierung der Muskeleiweißkörper ankam. Die Salzwirkungen zwischen p_H 6 und 8 treten aber im Gegensatz zu denen zwischen p_H 6 und 3 nicht so hervor, daß sie hierbei zu Zweifeln oder Irrtümern geführt hätten (z. B. *Quagliariello*, isoelektrischer Punkt des Myogens).

Die systematische Untersuchung der beschriebenen Salzwirkungen fand am Kaninchen statt, prinzipiell liegen die Verhältnisse beim Frosche ebenso (vgl. Abb. 6, Kurven I und II).

IV. Die Entionisierungsfällung.

Eine zweite Form der Denaturierung des Myogens in wässeriger Lösung scheint analog auch bei anderen Eiweißkörpern häufig vorzukommen[2]), beim Myogen aber besonders leicht und umfangreich aufzutreten. Während vorher nicht ionisiertes Myogen am isoelektrischen Punkte klar in Lösung bleibt, flockt es aus, wenn es vorher durch Alkali- oder Säurezusatz ionisiert war. Das unscharfe Flockungsoptimum wie der ziemlich scharfe Wanderungsumschlag dieses Umwandlungsproduktes liegen bei p_H 6,3 (Belege s. Experimenteller Teil, II., F., 2.). Breite und Mächtigkeit hängen von dem Grade der voraufgegangenen Alkalisierung bzw. Säuerung, also Ionisierung ab (Belege s. Experimenteller Teil, II., F. 1.). Sie kann nach starker Ionisierung fast alles Eiweiß umfassen. Sie ist nach Säuerung stärker als nach Alkalisierung. Die Bezeichnung Entionisierungsfällung soll über den inneren Mechanismus nichts aussagen, sondern nur angeben, daß der Fällungseffekt durch den Vorgang der Entionisierung sichtbar wird. Da diese Flockung die einzige ist, die im Muskelplasma mit physiologischer Salzkonzentration ihr Maximum bei p_H 6,3 hat, muß sie der Gegenstand der Beobachtung von *Collip*[3]) gewesen sein, da das Plasma bei ihm sein Fällungsoptimum bei p_H 6.6 bis 6,3 erreicht. Er dürfte also bei seinen Säuerungsversuchen von einem verhältnismäßig alkalischen Plasma ausgegangen sein. Angaben hierüber fehlen.

---

1) *G. Embden*, z. B. Naturwissenschaften, Jahrg. 11, S. 985, 1923.
2) Z. B. *R. Mond*, Pflügers Arch. **200**, 423, 1923.
3) *Collip*, a. a. O.

V. *Die Denaturierung durch Alterung.*

Das Myogen denaturiert auch, wenn es weder einer spezifischen Ionenwirkung noch einer Ionisierung mit folgender Entionisierung ausgesetzt ist, z. B. in reinen Dialysaten von $\Lambda = 1 - 2 \cdot 10^{-5}$ bei einem p_H zwischen 6,4 bis 6,7. Diese Denaturierung vollzieht sich im Gegensatz zu den anderen beiden Fällungstypen bei niederer Temperatur langsam in Tagen und Wochen. Sie wird bei höherer Temperatur, wie bei Eiweißkörpern selbstverständlich, stark beschleunigt (s. aber dazu VI. dieser Mitteilung). Sie war *Fürth*[1]) nicht nur bekannt, sondern ist auch von ihm genau untersucht. Er hat dafür das bekannte Denaturierungsschema aufgestellt: Myogen ⟶ lösliches Myogenfibrin ⟶ Myogenfibrin.

Das auf diese Weise entstandene Myogenfibrin zeigt denselben isoelektrischen Punkt für das Kaninchen bei p_H 6,3, für den Frosch bei p_H 6,0, wie das genuine Myogen. Dies gilt sowohl, wenn man in den fraglichen Prozeß eingreift, durch Koagulation des löslichen Myogenfibrins bei 40°, als auch nach rascher Fällung des Myogens selbst durch Temperaturen über 50°[2]) (Belege s. Experimenteller Teil, II, G, 1. bis 3.).

VI. *Der Einfluß der verschiedenen Denaturierungsformen auf die Koagulationstemperaturkurve und Ableitung von Regeln für die quantitative Trennung der Muskeleiweißkörper.*

In seiner auch sonst sehr umfassenden Charakteristik der Muskeleiweißkörper hat *Fürth*[3]) einen ganz besonderen Wert auf die Feststellung ihrer Koagulationstemperatur gelegt. Seine und seiner Schule Arbeiten über die quantitativen Verhältnisse der Muskeleiweißkörper im Muskel und seinen Extrakten unterscheiden die Fraktionen nur nach Koagulationstemperaturen.

Dieser Autor hat auch schon festgestellt, daß die Denaturierung des Myogens weniger als die anderer Eiweißkörper (z. B. des Serumalbumins) durch Temperaturerhöhung beschleunigt wird, sodaß sie in besonders hohem Maße von der Zeit der Wärmeeinwirkung und der Konzentration des Proteins abhängt. Dementsprechend fand er, daß die Koagulation bei raschem Erwärmen im allgemeinen schon bei 55° beginnt, aber — infolge der Konzentrationsabnahme, die mit der Flockung verbunden ist — erst bei 70° vollständig wird. Seine Unter-

[1]) *O. v. Fürth*, a. a. O.

[2]) Die Hitzedenaturierung wird als wesensgleich — nur durch die hohe Temperatur beschleunigt — angesehen mit der Denaturierung, die unter denselben Bedingungen langsam bei niederer Temperatur eintritt (s. dazu *Freundlich*, Kapillarchemie, S. 838 ff.)

[3]) *O. v. Fürth*, a. a. O.

suchungen fanden am Dialysat statt, das im allgemeinen einen p_H zwischen 6,5 und 7 hat.

Nun schwankt aber in Muskelextrakten, an denen die quantitativen Untersuchungen seiner Schule über die Menge der verschiedenen Eiweißkörper unternommen waren, der p_H recht beträchtlich. Außerdem war der Extraktionslösung vielfach 10proz. NH_4Cl zugesetzt [*Saxl*[1])]. Eine Identifizierung des Myogens im Preßsaft durch die von *Fürth* angegebene Flockungstemperatur ist also nur dann einwandfrei möglich, wenn diese für den ganzen im Preßsaft in Frage kommenden p_H-Intervall und auch in hochkonzentrierten Salzlösungen den von diesem Autor gefundenen Wert hat. Dies wurde untersucht: Abb. 5 und 6 zeigen

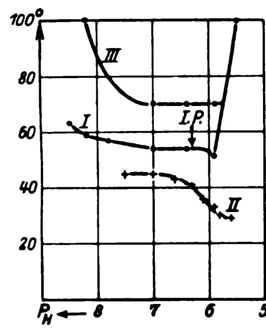


Abb. 5. Flockungstemperatur von Kaninchenmyogen bei verschiedenen p_H. Kurve I und Kurve III = untere und obere Flockungsgrenze in m/110 Puffer (s. Tabelle 1, S. 460). Kurve II = untere Flockungsgrenze in denselben Puffern + 9 Proz. NH_4Cl (s. zur Methodik auch exper. Teil, II, G, 1). I. P. = isoelektr. Punkt.

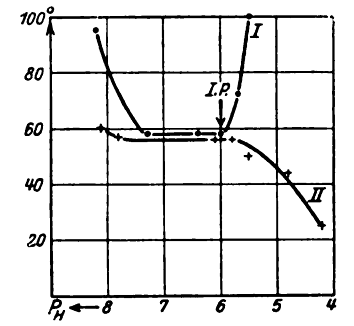


Abb. 6. Flockungstemperatur von Esculentenmyogen bei verschiedenem p_H. Kurve I = untere Flockungsgrenze in m/110 Puffern (s. Tabelle 2, S. 460). Kurve II = in demselben Puffer + 9 Proz. NH_4Cl. I. P. = isoelektr. Punkt.

den Verlauf der unteren Flockungsgrenze für verschiedene p_H bei m/110 Salzgehalt und in 9proz. NH_4Cl von einer mäßig konzentrierten Myogenlösung des Kaninchens und einer sehr verdünnten von Rana esculenta. Beim Kaninchen ist für m/110 Puffer als obere Flockungsgrenze die Temperatur eingezeichnet (Kurve III), bei der bei raschem Erwärmen auch die letzten Myogenspuren flocken. Als untere Fällungsgrenze sind die Gradzahlen in Celsius angegeben, bei denen verschiedene Myogenlösungen gleicher Konzentration kräftig flocken, wenn sie diese Temperatur in 2 Minuten erreichen.

Die untere Grenze der Flockung in m/110 Salz kann man ansehen als herrührend von einem Myogen, das in seiner Stabilität durch die Vorbehandlung *im wesentlichen* nicht beeinflußt ist. Diese Kurve bestätigt annähernd die *Fürth*schen Angaben über die Koagulations-

[1]) *P. Saxl*, Hofmeisters Beitr. 9, 1. 1906.

temperatur für eine p_H-Breite von etwa 5,7 bis 8,0. Sie liegt allerdings für nicht allzu verdünnte Eiweißlösungen etwas tiefer (54^0) als dieser Autor behauptet (s. oben). Außerhalb dieses p_H-Bezirks wird das Myogen durch seine steigende Ionisierung rasch stabil. Der Zustand der Ungerinnbarkeit wird wie bei den meisten Eiweißkörpern auf der alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes in bedeutend größerer Entfernung erreicht als auf der sauren. Dies bestätigt den langsameren Anstieg der Alkaliionisation, der auch aus der Überführungs- und osmotischen Kurve erschlossen wurde.

Der Verlauf der unteren Fällungsgrenze in 10proz. NH_4Cl und ebenso in m/110 Salz für das p_H-Intervall 8,0 bis 5,7 bedarf aus methodischen Gründen einer ausführlicheren Analyse. Diese zeigt gewisse im Prinzip gekennzeichnete Denaturierungsformen des Myogens (III und IV. dieser Mitteilung) in ihrem Auftreten in einer gegebenen Myogen- oder Preßsaftlösung. Es vollzieht sich unter den dort herrschenden Bedingungen zuweilen in einer Weise, die zunächst befremdlich wirkt, obwohl es sich um richtige Konsequenzen der unter III. und IV. geschilderten Gesetzmäßigkeiten handelt. Die im folgenden Abschnitt gegebene Klarlegung dieser Zusammenhänge gestattet zu vorläufigen Regeln für die quantitative Trennung der Muskeleiweißkörper des Presßsaftes zu kommen.

Die Einzelanalyse der unteren Fällungsgrenze ergibt nun: Die Kurve in 9proz. NH_4Cl verläuft überhaupt viel niedriger als die entsprechende in salzarmer Lösung — vermutlich infolge einer gewissen „Aussalzungs"tendenz so hoher Elektrolytkonzentrationen (etwa 2 mol.). Von etwa p_H 6 ab nach der sauren Seite senkt sie sich schnell infolge der spezifischen, fällenden Anionenwirkung.

Diese Salzwirkungen sind praktisch ausgeschaltet in m/110 Lösungen. Dennoch hat die Kurve I beim Kaninchen ihr Minimum nicht bei p_H 6,3 am isoelektrischen Punkt, sondern bei p_H 5,9. Dies beruht auf einer Stabilitätsminderung durch Ionisierung mit folgender Entionisierung: Myogen puffert besonders bei einer Säuerung über den isoelektrischen Punkt hinaus ganz außerordentlich stark; um also Myogen von seinem isoelektrischen Punkt hinweg auf einen bestimmten sauren p_H zu bringen, muß man nicht ein Puffergemisch der gewünschten [H˙] hinzusetzen, sondern ein weit saureres. Dadurch werden die Teilchen des Myogens, die zuerst mit dem einfließenden Puffergemisch in Berührung kommen, zunächst weit mehr ionisiert, als sie es nachher bleiben, wenn sich die [H˙] des Puffers beim Umschütteln durch Verteilung und Reaktion mit der gesamten Lösung abstumpft. Es kommt so zur Ionisierung und nachfolgender teilweisen Entionisierung einer gewissen Myogenmenge.

Der Grad dieser Entionisierung und vor allem die daran beteiligte Menge des Proteins hängt außer von der p_H-Differenz zwischen reinem Puffer und durchgeschütteltem Puffereiweißgemisch ab von der Art der Pufferzuführung. Läßt man ein größeres Volumen eines wenig konzentrierten Puffers langsam aus einer eingetauchten Pipette mit feiner Spitze unter dauerndem Schütteln einfließen, so wird er sich — mehr oder minder — sofort auf die ganze Myogenlösung verteilen und den endgültigen p_H des Puffereiweißgemisches annehmen. Fließt dagegen statt dessen ein kleines Volumen eines hochkonzentrierten Puffers auf einmal zu, so hält er an der Einflußstelle seinen verhältnismäßig sauren p_H fest und ionisiert dementsprechend — d. h. bedeutend mehr als im ersten Falle — das gerade dort befindliche Myogen. Infolgedessen geht der Ionisationsgrad des Proteins auch stärker zurück, wenn die $[H^{\cdot}]$ an der Einflußstelle durch Verteilung des Puffers auf die ganze Eiweißlösung absinkt.

Prinzipiell das gleiche gilt auf der alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes; doch ist dort in den angeführten Überlegungen statt $[H^{\cdot}]$ überall $[OH']$ zu setzen. Die Stabilitätsänderung ist aber geringer, da auf der alkalischen Seite das Myogen die Puffer weniger zum isoelektrischen Punkt hin neutralisiert und auch gegen solche Reaktionsschwankungen weniger empfindlich ist. Dies beruht auf der schon erwähnten geringeren Denaturierung durch Entionisierung nach Alkaliionisation (s. IV. dieser Mitteilung).

Die p_H-Differenz zwischen reinem Puffer und Puffereiweißgemisch wird dann *verhältnismäßig* gering, wenn die Pufferungspotenz des Eiweißes klein ist gegenüber der des Puffers[1]) (das ist bei sehr niedriger Konzentration des Proteins). Bei dem sehr verdünnten Froschmyogen der Abb. 6 ist diese Bedingung erfüllt (vgl. dazu Tabelle II). Bei vorsichtigem Pufferzusatz tritt infolgedessen bei keinem p_H eine merkliche Minderung der Lyophilie durch Entionisierung ein. Die Koagulationstemperatur ist am isoelektrischen Punkte am niedrigsten. Anders ist es bei dem vielfach konzentrierteren Kaninchenmyogen der Abb. 5. Dort ist die fragliche p_H-Differenz besonders auf der sauren Seite viel beträchtlicher (vgl. Tabelle I). Eine Stabilitätserschütterung ist bei p_H 5,9 zu bemerken.

---

[1]) Der Puffer muß also eine möglichst hohe Potenz haben. Für den fraglichen p_H-Intervall kommen nur Phosphate in Betracht, deren Pufferungspotenz [als (Na)-Phosphate] ist einigermaßen beträchtlich in so stark verdünnten Lösungen nur zwischen p_H 6,3 und 7,3. Deshalb fand die weitere Alkalisierung statt durch NH_3, die Säuerung durch Milchsäure. Die stärker puffernde Essigsäure empfiehlt sich nicht wegen ihrer Flüchtigkeit bei hohen Temperaturen.

Tabelle I.

Verschiebung des p_H eines Puffers durch eine mäßig konzentrierte Kaninchenmyogenlösung. Konzentration des Puffers nach Mischung mit dem Eiweiß m/100 (Versuch zu Abb. 5, Kurve I).

Puffer 1 ccm Phosphat von p_H:	7,1 + NH_3	7,1 + NH_3	7,1 + NH_3	7,1	6,7	6,2 + Milchsäure	6,2 + Milchsäure
p_H gemessen	—	—	8,8	7,2	6,6	3,9	3,5
p_H nach Zusatz von 3 ccm Myogen von p_H 6,1 . . .	8,4	8,2	7,8	7,0	6,4	5,9	5,5

Tabelle II.

Verschiebung des p_H eines Puffers durch eine sehr verdünnte Froschmyogenlösung. Konzentration des Puffers nach Mischung mit dem Eiweiß m/10 (Versuch zu Abb. 6, Kurve I).

Puffer 2 ccm Phosphat von p_H:	sec.	7,1	6,1	6,1 + Milchsäure	6,1 + Milchsäure	6,1 + Milchsäure
p_H gemessen	8,8	7,3	6,1	5,5	4,7	4,2
p_H nach Zusatz von 2 ccm Myogen von p_H 7,1 . . .	8,2	7,3	6,4	6,0	5,7	5,5

Setzt man unvorsichtig Puffer geringer Potenz (etwa Na_2HPO_4 + $NaOH$ oder NaH_2PO_4 + H_3PO_4) dem Myogen zu, so wird das Minimum der Koagulationstemperatur bei 5,9 viel auffälliger, und es tritt außerdem bei p_H 8 sehr deutlich ein zweites auf (Belege s. Experimenteller Teil, II, H, 2.).

Die bestpuffernde Myogenlösung ist der Muskelpreßsaft infolge seines Gehalts von etwa m/10 Phosphat. Suche ich ihn auf p_H 5,9 bis 5,7 oder p_H 6 zu bringen, etwa durch Säuren- oder Basenzusatz, so ist die geschilderte Reaktionsschwankung dabei so stark, daß bei diesen beiden p_H sogar bei Zimmertemperatur beträchtliche Flockungen entstehen. Es ergibt sich also das paradoxe Resultat, daß unzweckmäßig vorgenommene Steigerung der Ionisierung durch Säure- oder Alkalizusatz unter Umständen teilweise Entionisierungsfällungen hervorruft. Beträgt die endgültige $[H^{\cdot}]$ mehr als $10^{-9,0}$ oder weniger als $10^{-5,5}$, so sind die Reaktionsschwankungen im wesentlichen belanglos. Das Myogen ist dann so weit ionisiert, daß es klar in Lösung bleibt, auch wenn es durch Entionisierung oder eine Temperatur von 100° denaturiert ist (s. Experimenteller Teil, II, H, 2.).

So ergeben sich für die quantitative Trennung des Myogens von den lyophoben Muskeleiweißkörpern folgende Regeln:

1. Sie muß schnell erfolgen, da im Laufe der Zeit in jedem Falle etwas Myogen denaturiert (s. IV. dieser Mitteilung). Damit scheidet das Dialyseverfahren aus.

2. Die statt dessen von *Fürth*[1]) und *Saxl*[2]) angewandte Methode der fraktionierten Hitzekoagulation basiert auf der Voraussetzung, daß die untere Flockungsgrenze des Myogens bei raschem Erwärmen nicht unter 55° liegt und das Myosin bereits bei 52° restlos geflockt ist. Die angenommene Grenze ist für konzentriertes Myogen in salzarmen Lösungen selbst im günstigen p_H-Intervall etwas, in 9proz. NH_4Cl sogar um 10° zu hoch. Außerdem ist die Koagulationstemperatur in Abhängigkeit von den eben geschilderten Faktoren sehr inkonstant und mit dem p_H wechselnd. Da die *Fürth*sche Annahme auch bezüglich des Myosins nur bedingt richtig ist (s. zweite Mitteilung, IV.), erscheint die fraktionierte Wärmefällung als wenig geeignete Methode der quantitativen Trennung der Muskeleiweißkörper.

3. Die geeignete Methode ist die Fraktionierung durch Entladung. Ein seiner Ladung beraubtes lyophobes Kolloid flockt. Das Myosin ist (wie hier vorweggenommen sei, zweite Mitteilung, III.) in salzarmer Lösung lyophob und flockt dementsprechend an seinem isoelektrischen Punkte bei 5,1. Man darf also bei dieser Reaktion des Preßsaftes eine quantitative Abscheidung reinen Myosins aus der Myogenlösung erwarten, wenn zwei Vorbedingungen erfüllt sind.

a) Es muß die Anionenkonzentration niedrig, für die im Preßsaft enthaltenen wenig wirksamen Anionen zwischen m/50 bis m/100 sein, da bei p_H 5,1 auch das Myogen teilweise durch Anionen gefällt wird. Der Preßsaft ist dementsprechend auf das Fünf- bis Zehnfache zu verdünnen.

b) Es muß beim Ansäuern auf diese Reaktion jede Entionisierungsfällung vermieden werden. Dies geschieht durch vorsichtigen Zusatz stark verdünnter Säure von hoher Pufferpotenz, am besten durch ein stark verdünntes Acetatgemisch von p_H 4,3 bis 4,6.

Zusammenfassung.

1. Es wird erörtert, welche Bedeutung gewisse physiko-chemische Konstanten, wie die Lage des isoelektrischen Punktes für die bestehenden Kontraktionstheorien haben. Es wird dabei gezeigt, daß die für die Säurequellung des Muskeleiweißes angeführten Beweise nicht stichhaltig sind.

2. Der isoelektrische Punkt des genuinen Myogens des Kaninchens liegt innerhalb der untersuchten Variationsbreite, unabhängig von Art und Konzentration der Puffer bei p_H 6,3. Nicht ganz so gut gesichert erscheint seine davon abweichende Lage bei Rana esculenta bei 6,0.

[1]) *Fürth*, a. a. O.
[2]) *Saxl*, a. a. O.

3. Anwesenheit von Salzen vermindert von einer gewissen Konzentration an die Stabilität und bewirkt auf der sauren Seite des isoelektrischen Punktes eine Fällung in der Gegend p_H 5 und saurer. Ihre Größe hängt bei Alkali- und Erdalkalisalzen im wesentlichen nur von der Natur und Konzentration der Anionen ab. Diese lassen sich in dieselbe Reihe zunehmender Wirksamkeit ordnen, die auch *Michaelis* am Casein gefunden hat.

4. Mit der Zunahme der absoluten Fällungsgröße ändert sich auch der p_H des Flockungsoptimums: Es wandert von p_H 5 nach der sauren Seite.

5. Durch die Anionen wird nicht nur die Stabilität des Myogens geändert, sondern auch die elektrische Ladung des durch sie ausgeflockten Anteils — aber nur dieses Anteils. Die Flocken haben ihren isoelektrischen Punkt in der Gegend p_H 5 (s. dazu S. 451).

6. Mit Beseitigung der Anionen ist die Umladung schnell und völlig reversibel. Der isoelektrische Punkt ausgewaschener Flocken liegt wieder bei p_H 6,3.

7. Die Anionenwirkung wird an Hand der *Michaelis*schen und *Jaques Loeb*schen Anschauungen über Stabilität und Ladung von Proteinen diskutiert.

8. Ionisiertes Myogen wird bei der Entionisierung denaturiert. Die Flockung wird um so umfangreicher, je stärker ionisiert das Myogen vorher war und je vollständiger es entionisiert wird, d. h. je näher die endgültige Reaktion bei p_H 6,3 liegt. Der Wanderungsumschlag dieser Flocken liegt bei p_H 6,3.

9. Der isoelektrische Punkt des Myogens, das nach dem bekannten *Fürth*schen Schema Myogen → lösliches Myogenfibrin → Myogenfibrin ohne Reaktionsschwankungen und Ionenwirkungen durch Alterung denaturiert ist, liegt gleichfalls bei p_H 6,3.

10. Der Einfluß dieser Denaturierungsformen auf den Verlauf der Koagulationstemperaturkurve bei variiertem p_H wird gezeigt. Daraus werden vorläufige Regeln über die quantitative Trennung der Muskeleiweißkörper abgeleitet.

Experimenteller Teil.

I. Allgemeine Methodik.

A. Gewinnung des Preßsaftes. Der Preßsaft stammt aus der Muskulatur der hinteren Extremitäten. Etwa dreipfündige Kaninchen wurden unblutig durch Genickschlag, große Esculenten durch Dekapitieren getötet. Dann wurden sie mit Ringer- oder physiologischer NaCl + $NaHCO_3$-Lösung von der Aorta abdom. zur Vena cava inferior, bzw. beim Frosch zur Vena abdom. ausgespült. Die Menge der Spülflüssigkeit betrug, bis klare Lösung aus der Vene abtropfte, beim Kaninchen etwa 1 Liter, beim Frosch etwa

80 ccm. Es wurden aber trotzdem bei letzterem etwa 100 bis 200 ccm verwandt. Die Muskulatur der Eskulenten war dann überhaupt marmorblaß, die der Kaninchen bis auf einige rote Muskeln. Die hinteren Extremitäten waren besonders beim Frosch ödematös. Die Zerkleinerung des Fleisches erfolgte beim Kaninchen durch zweimaliges Durchgeben durch eine gut schneidende, auf „sehr fein“ eingestellte Fleischmaschine, beim Frosch mit der Schere auf dem Porzellanbrett. Der Saft wurde mit einer in die Wand eingelassenen, sehr kräftigen Handpresse mit flachem Gewinde und langem Hebelarm, die die Anwendung hoher Drucke gestattete, ausgepreßt. Er war beim Kaninchen rötlich, beim Frosch gelblich trübe. Sein p_H betrug 6,3 bis 5,8. Maßnahmen gegen Milchsäurebildung (etwa Eisbehandlung) wurden nicht getroffen.

B. Dialyse. Die Dialyse fand in ziemlich kleinporigen Kollodiumhülsen statt, da das Myogen anscheinend sehr fein dispers ist und leicht durch die Membran geht. Die Hülsen wurden nach dem *Trendelenburg*schen[1]) Verfahren über gelatinierten Röhren hergestellt. Sie faßten 10 bis 30 ccm und waren mit ihrem oberen Rand um Glasmanschetten befestigt. Dies geschah durch Kollodium, das mit Heißluft rasch und völlig impermeabel erhärtet wurde. In diese Manschetten wurden vielfach ausgekochte Gummistopfen mit Steigrohr eingesetzt, um Verdünnung durch osmotisch verursachtes Überlaufen während der Dialyse zu verhindern. Die Leitfähigkeit betrug nach 24 Stunden meist gegen 10^{-3}, nach 3 bis 5 Tagen 10^{-4} und blieb dann so[2]). Die Dialyse fand im Eisschrank im Sommer immer mit, sonst auch ohne Toluol statt. Nach Ausflocken der lyophoben Eiweißsubstanzen filtriert das Myogen mühelos goldklar ab. Es zeigt dann keine Spur eines Hb- oder Hämatinspektrums. Sein p_H betrug meist etwa 6,5. Die völlige Myosinfreiheit wird gesichert, wenn die Dialyse bei p_H 5,8 bis 6,0 stattfindet, da bei dieser Reaktion das Myosin selbst bei Salzgegenwart in einigen Stunden flockt. In den späteren Versuchen wurde dieser p_H deshalb durch Dialyse gegen sehr verdünnte reine Essigsäure (10^{-3} bis 10^{-4} mol.) festgehalten.

Das von *Fürth*[3]) empfohlene Verfahren der Myosinbeseitigung durch Erwärmen auf 52° erfüllt seinen Zweck bei neutraler bis leicht alkalischer Reaktion nur unsicher (s. dazu zweite Mitteilung, IV). Andererseits flocken dabei nicht unbeträchtliche Myogenmengen. Bei dem angegebenen Dialysierverfahren ist Erwärmen überflüssig.

Durch Elektrodialyse in einem Mikroapparat nach *Pauli*[4]) (von *Köhler*, Leipzig) wurde gelegentlich die Leitfähigkeit von $1 - 2 . 10^{-4}$ auf $1 - 2 . 10^{-5}$ erniedrigt. Es wurden dabei zwei Chromgelatinemembranen, also auch auf der Kathodenseite eine verwendet, was anscheinend bei Anwesenheit mehrwertiger Anionen Reaktionsausschläge nach der sauren Seite besser verhindert als die Verwendung abgestimmter Membranen[5]).

---

[1]) *Trendelenburg*, Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol. **199**, 237, 1923.

[2]) Die verhältnismäßig rasche Dialyse dürfte auf der Lage des isoelektrischen Punktes beruhen, die bewirkte, daß die Dialyse bei einem p_H des destillierten Wassers von 6,3 bis 6,5 bei ungefähr isoelektrischer Reaktion stattfand. Jedenfalls liegt die große Geschwindigkeit der Dialyse nicht an der Großporigkeit der Hülsen.

[3]) *O. v. Fürth*, Arch. f. d. exper. Pathol. u. Pharm. **36**, 240, 1895.

[4]) *W. Pauli*, diese Zeitschr. **152**, 355, 1924.

[5]) Z. B. *R. Stern*, ebendaselbst **144**, 115, 1924.

Das Dialysat enthielt immer — allerdings meist sehr geringe — Mengen Serumalbumins.

C. Die elektrische Überführung. Sie fand statt nach den Vorschriften von *Michaelis*[1]). Die makroskopische Kataphorese wurde nach seinen Vorschriften für umkehrbare Überführung vorgenommen. Die Leitungsspannung betrug 220 Volt. Der Potentialabfall pro Zentimeter war unbekannt. Trotzdem sind die Wanderungsgeschwindigkeiten der Gelbfärbung in Millimeterstunden in den Tabellen I bis V vielfach angegeben. Ihr Vergleich bei verschiedenem p_H gestattet in Puffergemischen derselben Konzentration ein gewisses Urteil über die Zuverlässigkeit der Befunde, auch wenn diese nicht eigentlich quantitativ zu werten sind. Da infolge der beträchtlichen äußeren Spannung die *Joule*sche Wärmeentwicklung im Überführungsapparat — besonders in m/30 Puffern — recht groß ist und zu Strömungserscheinungen führt, wurde der Apparat in ein Wasserbad von Zimmertemperatur versenkt. Dessen gläserne Wände erlaubten Beobachtung der Wanderung, die dadurch besonders erleichtert wurde, daß die Brechungsunregelmäßigkeiten an der Ansatzstelle der Seitenteile des Kataphoreseapparats an den Hähnen durch das Wasserbad optisch unwirksam gemacht wurden. Man konnte so die Eiweißlösung selbst unmittelbar an der Hahnbohrung abgrenzen. Die Beobachtung der Wanderung erfolgte vor einem weißen durchscheinenden Hintergrund.

Bei der hohen Pufferungspotenz des Myogens — besonders auf der sauren Seite seines isoelektrischen Punktes — kann man den gleichen p_H in Mittel- und Seitengefäß nicht einfach durch Zugeben eines Puffers gleicher C_H herstellen. Man muß den p_H der Myogenpuffermischung messen und danach einen Puffer gleicher C_H für die Seitenteile aussuchen. Die Versuchsdauer betrug bis höchstens 2 Stunden. Es blieb so der p_H meist konstant. Die höchste Änderung in den Seitengefäßen betrug 0,15.

Auch die mikroskopischen Überführungsversuche fanden nach den *Michaelis*schen Vorschriften statt. Es wurde in einer Kammertiefe von genau $^1/_5$ oder $^4/_5$ beobachtet. Bei beiden Methoden erfolgte Kontrolle der anfänglichen Wanderungsrichtung durch Umkehrung des elektrischen Stromes.

D. Die p_H-Messung. Sie wurde elektrometrisch oder kolorimetrisch (oft beides nebeneinander) nach den entsprechenden Vorschriften von *Michaelis*[2]) vorgenommen.

II. Die Versuchsanordnung und Resultate im einzelnen.

A. Überführungsversuche am Kaninchenmyogen.

Das Kaninchenmyogen war nach gründlicher Dialyse ($\Lambda = 10^{-4}$ bis 10^{-5}) myosinfrei. Der Inhalt des Seitenteils, in den die gelbe Farbe des Myogens gewandert war, zeigte bei nachträglichem Kochen die bei weitem stärkere Flockung. Besonders bei kathodischer Wanderung war aber auch im Anodenraum bei Erhitzen auf 100° vielfach eine schwächere Trübung auch in größerer Entfernung vom isoelektrischen Punkt nachzuweisen. Es dürfte sich hierbei um Serumalbuminspuren gehandelt haben, nicht um Myogen, das durch Wärmeströmungen verschleppt war: Die Flocken des Eiweißes, das in den Anodenraum gekommen war, wanderten nämlich auch bei gesonderter Überführung des Anodeninhaltes unter dem Mikroskop anodisch.

---

[1]) *L. Michaelis*, Praktikum d. physik. Chem. Berlin, Julius Springer, 1922.

[2]) *L. Michaelis*, z. B. a. a. O.

Tabelle I. m/30 Phosphat.

Herstellung	p_H am Anfang	p_H unt. Hitzeflockung (100°) am Schluß: des Anodenteils	p_H unt. Hitzeflockung (100°) am Schluß: des Kathodenteils	Wanderung in mm/Std.	Versuchsdauer
Gewöhnl. Dialyse	6,7	6,6 milchig	6,7 Hauch?	6 mm anod.	1 Std.
„ „	6,25	—	—	steht still	1 „
„ „	5,9	5,9 g. l. trübe	5,8 schw. milch.	4 mm kath.	1 „
„ „ erhitzt (54°)	5,75	5,7 milchig	5,7 dickm. m Fl.	6 „ „	1 „
Elektrodialyse .	5,6	5,5 opal.	5,6 trübe	8 „ „	30 Min.
Gewöhnl. Dialyse	5,5	5,6 „	5,45 milchig	9 „ „	30 „

Tabelle II. m/60 Phosphat.

Gewöhnl. Dialyse	6,6	6,6 milchig	6,55 Hauch?	4 mm anod.	1 Std.
„ „	6,25	6,25 schw. trübe	6,25 schw. trübe	steht still	1 „
„ „	6,1	6,1 schw. milch.	5,95 dick milch.	6 mm kath.	1 „
„ „	5,8	—	—	8 „ „	1 „

Tabelle III. m/120 Phosphat.

Gewöhnl. Dialyse	6,9	7,0 schw. milch.	6,9 klar	10 mm anod.	2 Std.
Elektrodialyse .	6,7	6,65 milchig mit Flocken	6,6 Hauch?	anodisch	1 „
„ . .	6,3	leicht trübe	leicht trübe	steht still	30 Min.
Gewöhnl. Dialyse	5,95	5,9 trübe	5,85 trübe	6 mm kath.	30 „

Tabelle IV. m/120 Acetat.

Elektrodialyse .	6,6	6,45 trübe	6,6 opal.	8 mm anod.	30 Min.
„ . .	6,0	6,15 klar	6,05 leicht trübe	6 „ kath.	40 „
Gewöhnl. Dialyse	5,7	5,75 opal.	5,6 milchig	11 „ „	90 „
Elektrodialyse .	5,6	5,6 Hauch	5,5 „	16 „ „	30 „
Gewöhnl. Dialyse erhitzt (54)	5,6	5,6 „	5,6 schw. milch.	14 „ „	30 „

B. Überführungsversuche an Myogen von Rana esculenta.

Da der zarte Eskulentenmuskel bei der Ausspülung viel ödematöser wird als der des Kaninchens, war auch der Preßsaft viel verdünnter und farbloser. Vielleicht ist auch das Eskulentenmyogen an sich blasser. Wollte man für die Überführung eine überhaupt noch abgrenzbare Gelbfärbung haben, so durfte man nicht zu lange dialysieren (Konzentrationsverminderung durch Alterung). Infolgedessen kam das Dialysat bereits mit einer Leitfähigkeit von etwa 10^{-3} zur Verwendung. Es war deshalb die Anwesenheit von Myosin nicht auszuschließen. Dessen anodische Wanderung bei einer Reaktion, bei der das Myogen kathodisch wandert, mußte um so stärker stören, als bei der blassen Farbe der Eiweißlösung die Hitzeflockung im Kathoden- bzw. Anodenraum weitgehend zur Beurteilung der Wanderungsrichtung herangezogen werden mußte. Es fragt sich demnach, ob der anscheinend etwas saurere isoelektrische Punkt des Eskulentenmyogens nicht durch Myosinbeimengungen vorgetäuscht ist.

Infolge der hohen Leitfähigkeit des Dialysats wurde nicht nur p_H, sondern auch Δ des Myogenpuffergemisches gemessen und danach außer dem

p_H auch die Leitfähigkeit (durch entsprechend höhere Pufferkonzentration) in den Seitenteilen eingerichtet. Die Leitfähigkeit des Inhalts des Überführungsapparats entsprach im allgemeinen einer Phosphat- oder Acetatkonzentration von m/40 bis m/80 in den Seitenteilen. Die Leitfähigkeit des Mittelgefäßes setzt sich zusammen aus der der Salze, die in der Myogenstammlösung enthalten waren, und der der Puffer. Infoldessen war dort die Konzentration des zugesetzten Acetats bzw. Phosphats niedriger (etwa m/300). Hieraus hätten theoretisch Änderungen des p_H an der Diffusionsgrenze Mittel- zu Seitenteil entspringen können[1]). Sie wurden praktisch nicht beobachtet.

Tabelle V.

Puffer: Phosphat und Acetat.

Maßnahmen zur Myosinbeseitigung	Λ	p_H am Anfang	p_H unt. Hitzeflockung (100°) am Schluß des Anodenteils	p_H unt. Hitzeflockung (100°) am Schluß des Kathodenteils	Wanderung in mm/Std.	Versuchsdauer
Preßsaft auf 45° erhitzt . . .	$1{,}3 \cdot 10^{-3}$	6,5	6,6 f. milch.	6,6 Hauch	8 mm anod.	30 Min.
	$1{,}3 \cdot 10^{-3}$	6,4	—	—	6 „ „	30 „
	$8{,}3 \cdot 10^{-4}$	6,3	6,4 trübe	6,4 Hauch?	2 „ „	30 „
	$1{,}7 \cdot 10^{-3}$	6,1	6,1 l. trübe	6,05 opal.	?	30 „
Dialysat auf p_H 5,7 gebracht, Niederschlag abfiltriert . . .	$1{,}1 \cdot 10^{-3}$	5,9	5,9 Hauch	5,9 opal.	?	30 „
Dialysiert bei p_H 5,4 wasserklar, myosinfrei . .	$1{,}4 \cdot 10^{-3}$	5,8	5,9 opal.	5,7 d. milch.	7 mm kath.	3 Stdn.
	$1{,}0 \cdot 10^{-3}$	5,6	5,6 „	5,6 „ „	11 „ „	1 Std.

C. Osmotische Versuche.

Der osmotische Druck wurde in Serienversuchen mit variiertem p_H gemessen. Die osmotischen Zellen faßten etwa 3 ccm. Sie wurden genau kalibriert, ebenso die kapillaren Steigrohre[2]), um die Verdünnung durch Füllung des Steigrohrs rechnerisch ausschalten zu können. Dagegen wurde nicht auf 0° umgerechnet, da es nur auf den Gang der Kurve mit dem p_H, nicht auf die absolute Größe des osmotischen Druckes ankam. Aus demselben Grunde wurde auch die Konzentration der Stammlösung nicht bestimmt. Die Zellen wurden genau wie die Dialysehüllen hergestellt. Sie waren also kleinporig, um für Myogen absolut undurchgängig zu sein. Ihre Durchgängigkeit für Salze wurde immer, die für Wittepepton vor Versuch 1 geprüft. Essigsäure bzw. NaOH zur Regelung der p_H wurde

[1]) Dies folgt aus dem Massenwirkungsgesetz: $[H^\cdot] = K \frac{\text{Säure}}{\alpha\text{-Säuresalz}}$ als Dissoziationsgleichung für schwache Säuren sagt, daß sich $[H^\cdot]$ ändert, wenn sich ceteris paribus α (der Dissoziationsgrad des Salzes) ändert. Dies geschieht bei Verdünnung des betreffenden Säuresalzes, wie sie bei Mischung verschiedenartiger Puffer gleicher $[H^\cdot]$ eintritt.

[2]) In den Steigrohren stieg Wasser durch Kapillarattraktion zwischen 10 und 15 mm.

nur außen zugegeben, sodaß bei ungenügendem Diffusionsausgleich höchstens eine scheinbare Verminderung des osmotischen Druckes der Proteinsalze eintreten konnte. Infolgedessen war die Einstellungszeit beträchtlich. Um Zersetzung des Eiweißes während der langen Versuchsdauer hintanzuhalten, wurden die Außenlösungen unter Toluol gehalten. Außerdem fanden die Versuche bei niederer Temperatur statt (s. u. etwa 9°). Das Ausbleiben von Zersetzungserscheinungen wurde kontrolliert, indem eine Zelle mit reinem Myogen in destilliertem Wasser beigegeben wurde. Ihre Leitfähigkeit war am Schlusse gegenüber dem Anfang im wesentlichen unverändert. Es wurden drei derartige Versuchsserien angestellt. Die Kurve der Abb. 1 setzt sich aus den Ergebnissen der beiden hier angeführten zusammen.

Versuch 1.

p_H durch Essigsäure-NaOH, $T = 9^0$.

p_H innen	p = Druck in Millimeter H_2O nach 26 Stdn.	nach 64 Stdn.	$p_{max.}$ beobachtet	p korrig.[1]	Außenlösung Kochprobe nach Neutralisation	Biuret nach Filtr. d. Hitzekoagulums
3,29	889	896	896	1303	negativ	negativ
3,93	853	845	853	1296	„	„
4,49	434	454	454	551	Hauch	„
4,57	428	475	475	582	g. schw. opal.	—
5,22	254	260	260	299	negativ	negativ
6,8	90	88	90	93	„	—
8,0	143	150	151	168	„	negativ

Versuch 2.

p_H durch Essigsäure-NaOH, T = 3 bis 6° (maximale Abweichung 1 bis 13°) Δ der Myogenlösung am Anfang 27 . 10^{-6}, am Schlusse 54 . 10^{-6} [2]).

p_H innen	p = Druck in Millimeter H_2O nach 44 Stdn.	nach 96 Stdn.	$p_{max.}$ beobachtet	p korrig.	Außenlösung Kochprobe nach Neutralisation
5,4	214	226	226	260	negativ
5,65 {	170	166	170	190	„
	149	168	168		opal.
6,1	112	107	169 = Anfangswert	110	leicht trübe
6,25	92	92	92	95	negativ
6,4	91	81	97 = Anfangswert	83	„

[1]) p korr. $= \frac{p_1 \cdot v_1}{v}$; p_1 = beobachteter Druck in Millimetern H_2O, v_1 = Volumen am Versuchsschluß, v = Vol. am Versuchsbeginn.

[2]) Leitfähigkeitszunahme bis etwa z. B. 50 . 10^{-6} dürfte nach *Pauli* nicht auf Zersetzungserscheinungen, sondern CO_2-Aufnahme beruhen. (s. diese Zeitschr. **152**, 366, 1924).

D. Die Anionenfällung.

Die Konzentration der verwendeten Salzstammlösungen wurde sehr sorgfältig eingestellt: Zu Na-Acetat, Lactat, Sulfat und Sulfosalicylat wurden die entsprechenden Normalsäuren mit genau normaler Natronlauge gemischt. Die Milchsäure und Sulfosalicylsäure wurde durch Titration gegen NaOH (Indikator: Phenolphthalein) auf normal eingestellt. $Ca(NO_3)_2$ wurde auf richtige Konzentration analysiert nach dem Permanganatverfahren, $CaCl_2$ durch Titration gegen $AgNO_3$, KSCN und $AgNO_3$ gegen die NaCl-Stammlösung. Nur diese war allein durch Wägung des im Tiegel geglühten NaCl auf ihren richtigen Gehalt gebracht.

Die Salzpuffergemische waren vor Versuchsbeginn fertig, das Eiweiß floß aus einer großen graduierten Pipette zu, sodaß bis zu 100 Reagenzgläser in etwa 15 Minuten beschickt werden konnten. Da die maßgebende Ablesung erst in der dritten Stunde danach angestellt wurde, dürfte diese Zeitdifferenz keinen Einfluß auf die Fällungsgröße mehr gehabt haben. Bewertung und Größe der Fällung ist im allgemeinen Teil angegeben.

E. Die Umladung der durch Anionen gefällten Myogenflocken und die Reversibilität der Ladungsänderung.

1. Tabelle des Wanderungsumschlags in verschiedenen Salzen.

Salzgemisch	p_H gemessen	Mikroskopische Kataphorese
m/50 Acetat in	5,5	anodisch
m/100 „	5,2	kathod.
m/50 ClNa „	5,6	anodisch
m/100 Acetat	5,2	kathod.
m/50 Lactat-Na „	5,6	anodisch
m/100 Acetat	5,2	kathod.
m/50 H_2PO_4-Na „	5,55	anodisch
m/100 Acetat	5,25	kathod.
m/50 NO_3-Na „	5,6	anodisch
m/100 Acetat	5,2	kathod.

Salzgemisch	p_H Mitte vorher	p_H Mitte nachher	p_H Seite vorher	p_H Seite nachher	Makroskopische Kataphorese mm-Std.	Versuchsdauer
m/200 SO_4-Na_2 in m/200 Acetat	5,65	5,7	5,65	5,65	8 mm anod.	30 Min.
	5,3	5,3	5,25	—	anodisch	30 „
	5,0	5,05	4,96	—	kathodisch	30 „

2. Reversibilität und Geschwindigkeit der Ladungsänderung.

Stammlösung 8 ccm Na-Acetat-Myogen von p_H gemessen	Spalte I 2 ccm Stammlösung + 0,1 ccm m/10 Na_2SO_4 (m/200 Na_2SO_4) mikroskop. Kataphorese	Spalte II Lösung Spalte I + 0,4 ccm m/10 Na_2SO_4 (m/50 Na_2SO_4) mikroskop. Kataphorese	Spalte III Lösung Spalte II 2 ccm + 6 ccm Stammlösung (m/200 Na_2SO_4) mikroskop. Kataphorese
5,6	anodisch	anodisch	anodisch
5,1	kathodisch	„	kathodisch
4,85	—	kathodisch	—

3. Die Rückverlagerung des isoelektrischen Punktes auf die isoelektrische Reaktion des genuinen Myogens (vollständige Reversibilität der Ladungsänderung).

Myogen wurde durch Sättigung mit NaCl bei $p_H < 4$ fast vollständig gefällt, dann auf der Zentrifuge gewaschen, bis die Leitfähigkeit des Waschwassers $2 . 10^{-5}$ betrug. Dann wurde die zerriebene Suspension eingebracht.

m/100 Puffer	p_H gemessen	Mikroskopische Kataphorese
Phosphat . . 6,7	6,7	anodisch
Acetat 5,9	6,1	kathodisch

4. Die Rückverlagerung des isoelektrischen Punktes wurde außer durch Kathaphorese durch Quellungsmessung bestimmt. Eine mit Essigsäure auf p_H 4,1 angesäuerte reine Myogenlösung wurde mit m/10 Na_2SO_4 zum großen Teil gefällt. Die Fällung wurde auf der Zentrifuge zunächst mit m/100 Acetat 5,9 + etwas NaOH gewaschen, sodaß eine Reaktion zwischen p_H 5 und 6 resultierte, dann einige Male mit destilliertem Wasser. Hierauf wurde der Niederschlag mit Aqua dest. zu einer rahmigen Suspension durchgeschüttelt und mit der Pipette gleichmäßig auf fünf graduierte Zentrifugengläser verteilt. Da die Graduierung der käuflichen Gläser nicht zuverlässig ist, wurde sie jedesmal durch Füllung aus einer Pipette korrigiert. Die Suspension wurde dann zusammenzentrifugiert und festgestellt, daß ihr Volumen in allen Gläsern gleich war (Ablesegenauigkeit: 0,05 ccm). Hierauf wurden die Lösungen eingefüllt, in denen das Eiweiß quellen sollte, umgerührt und umgeschüttelt und nach wechselnder Zeit 10 Minuten mit 2000 Touren zentrifugiert. Wieweit Protein in Lösung gegangen war, wurde aus der Trübung der überstehenden Flüssigkeit bei Zusatz von Sulfosalicylsäure ersehen. Außer der Lage des isoelektrischen Punktes in verdünnten indifferenten Pufferlösungen wurde der Einfluß von 5 Proz. NH_4Cl auf Quellung und Löslichkeit festgestellt.

Salzgemisch	p_H gemessen	Korrig. (s. o.) Vol. zentrifugiert nach 12 Stdn.	Mikroskopische Kataphorese	2 ccm der überstehenden Lösung + Sulfosalicylsäure	Salzgemisch	Korrig. Vol. sofort zentrifugiert	p_H gemessen	2 ccm *) der überstehenden Lösung nach 12 Stdn. + Sulfosalicylsäure
m/100 Phosphat	7,1	1,45	anod.	Hauch	Es wurde so viel NH_4Cl in Substanz hinzugegeben, daß in jedem Röhrchen eine 5 proz. Lösung resultierte	1,45	6,8	Hauch
m/100 Acetat	5,9	1,5	kath.	leichte Trübung		1,45	6,4	leicht opal.
	5,4	1,6	—	„ „		1,45	5,6	„ „
	5,1	1,65	—	„ „		1,45	5,1	Hauch
	4,9	1,75	—	„ „		1,45	4,9	Spur Hauch

*) Während der 12 Stunden war die Suspension wieder aufgeschüttelt und wurde zur Sulfosalicylsäureprobe noch einmal abzentrifugiert.

F. Die Entionisierungsfällung.

1. Der Einfluß der Ionisierungsgröße.

Das Myogen wurde durch abgestuften HCl-Zusatz verschieden stark ionisiert, der Cl-Gehalt durch entsprechende Abstufung von KCl konstant gehalten.

0,3 ccm Dialysat + 5 ccm	Fällung	p_H gemessen	Davon wurden je 2 ccm neutralisiert durch	Fällung nach 1/2 Std.	p_H gemessen
m/300 HCl in m/8 KCl . .	klar	2,86	0,2 ccm mol./3 Phosphat 6,3	++++	6,2
m/600 HCl in m/600 KCl . .	„	3,6	0,2 „ mol. 3 „ 6,3	++ (+)	6,2
m/1200 HCl in m/400 KCl .	„	4,0	0,2 „ mol. 3 „ 6,3	++	6,3
m/2400 HCl in m/343 KCl .	„	4,8	0,2 „ mol. 3 „ 6,3	+	6,3
m/4800 HCl in m/320 KCl .	„	5,6	0,2 „ mol. 3 „ 6,3	klar	6,3

2. Das Flockungsoptimum und der isoelektrische Punkt.

Um die Entionisierungsflockung rein ohne Anionenfällung zu erhalten, muß das ionisierte Myogen in sehr verdünnten Puffern aufgefangen werden. Außerdem müssen die Puffer auch bei Zuführung saurer oder alkalischer Eiweißlösung ihre Reaktion festhalten. Im anderen Falle würde sich die bei bestimmten p_H durch Reaktionsschwankungen (s. dazu Allgemeiner Teil, VI) hervorgerufene Form der Entionisierungsfällung zu der absichtlich erzeugten addieren. Es würde so das Flockungsoptimum verschoben. Daß dies nicht der Fall war, geht aus dem Fehlen jeder Trübung in den Kontrollen hervor.

a) Alkali-Myogenat.

Versuch				Kontrolle			
0,4 ccm m/200 NaOH-Myogen + 5 ccm m/200	p_H gemessen	Fällung	Mikroskopische Kataphorese	0,4 ccm Myogen + 5 ccm m/200	Fällung	Fällung nach Zugabe von 0,02 ccm m/10 NaOH	p_H gemessen
Phosphat . 6,7	6,8	+	anod.	Phosphat . 6,7	klar	klar	6,8
„ . 6,5	6,6	++	—	„ . 6,5	„	„	6,6
Acetat . . 5,8	6,3	++	anod.	Acetat . . 5,8	„	„	6,3
„ . . 5,7	6,1	++	?	„ . . 5,7	„	„	6,1
„ . . 5,2	5,5	(+)	kathod.	„ . . 5,2	„	„	5,5

b) Säure-Myogen.

Versuch				Kontrolle			
0,4 ccm m/200 HCl-Myogen + 5 ccm m/200	p_H gemessen	Fällung	Mikroskopische Kataphorese	0,4 ccm Myogen + 5 ccm m/200	Fällung	Fällung nach Zugabe von 0,02 ccm m/10 Cl	p_H gemessen
Phosphat . 7,4	7,3	++++	—	—	—	—	—
„ . 7,0	7,0	+++++	—	Phosphat . 7,4	klar	klar	7,3
„ . . 6,8	6,8	+++++	anod.	„ . 6,8	„	„	6,8
„ . 6,7	6,6	+++++	?	„ . 6,7	„	Hauch?	6,55
„ . 6,45	6,3	+++++	?	„ . 6,45	„	„	6,3
Acetat . . 5,8	5,7	+	kathod.	Acetat . . 5,8	„	klar	5,7
„ . . 5,7	5,5	(+)	—	„ . . 5,7	„	„	5,6

G. Isoelektrischer Punkt der durch Alterung verursachten Flockung.

1. des hitzedenaturierten löslichen Myogenfibrins (Kaninchen).

Stammlösung	1 ccm der Stammlösung + 2 ccm m/100	p_H gemessen	Mikroskop. Kataphorese der Trübung
4 Tage altes m/100 Acetat-Myogen auf 41° gibt leichte Trübung	Acetat	6,7	anodisch
	„	6,0	kathodisch

2. des hitzedenaturierten Myogens (Kaninchen).

Stammlösung	1 ccm der Stammlösung + 1 ccm m/50	p_H gemessen	Mikroskop. Kataphorese der Trübung
Myogenlösung auf 54° gibt kräftige Trübung	Phosphat	6,7	anodisch
	Acetat	6,2	kathodisch
	„	5,8	„

3. des hitzedenaturierten Myogens (Rana esculenta).

2 ccm Myogen + 2 ccm m/55	Erwärmt auf °C	Mikroskopische Kataphorese der Flockung	p_H gemessen
Phosphat	57	anodisch	6,42
„ + Milchsäure	59	?	6,04
	72	kathodisch	5,74

H. Die Koagulationstemperaturkurve.

1. Die allgemeine Versuchsanordnung geht aus den Angaben des allgemeinen Teiles hervor. Die Erwärmung selbst fand in einem großen Becherglas als Wasserbad statt, das vorher 2 bis 3° über die voraussichtliche Flockungstemperatur erwärmt war; der Reagenzglasinhalt brauchte dann nicht länger als 2 Minuten, bis er diese Temperatur erreichte. Näherte er sich ihr etwas zu schnell, so wurde das Reagenzglas einen Augenblick herausgehoben. Man konnte so die Erwärmungsdauer mit einiger Übung bis auf wenige Sekunden genau auf 2 Minuten einrichten. Die Flockungstemperatur wurde abgelesen an einem im Reagenzglas selbst befindlichen Thermometer, mit dem während der Erwärmung dauernd umgerührt wurde.

Da das hier verwendete Myogen immer Albuminspuren enthielt, waren Myogenlösungen, aus denen alles Myogen auskoaguliert war, nicht ganz eiweißfrei. Die obere Fällungsgrenze (der Abb. 5) ist darum nicht so exakt bestimmt wie die untere. Sie war daran erkennbar, daß nach einer letzten kräftigen Flockung nur noch eine spärliche auftrat, die im Gegensatz zum denaturierten Myogen bei p_H 6,0 bis 5,8 im elektrischen Feld anodisch wandert.

2. *Der Einfluß der Entionisierung auf die Koagulationstemperaturkurve bei unzweckmäßigem Pufferzusatz*:

Die unten angegebenen Puffer befanden sich im Reagenzglas, die Eiweißlösung floß zu. Sämtliche Proben wurden gleichzeitig in einem

2-Liter-Becherglas als Wasserbad erwärmt. Die Zeit bis zur Fällung war also für höhere Flockungstemperaturen größer als für niedere. Die Unterschiede der Koagulationstemperatur erscheinen also höchstens zu klein.

Myogen (Kaninchen), 15 Minuten erhitzt auf 50 bis 52°, Niederschlag abfiltriert.

	1	2	3	4	5	6	7	8
In m/30 Phosphat (bzw. Phosphat + NaOH oder Phosphat + H_3PO_4) trat bei p_H gemessen	8,8	8,61	8,25	7,7	6,9	6,0	5,7	5,4
milchige Trübung ein bei °C	100 nicht	59,5	52	54	55,5	51,5	47	100 nicht

Das kolloidale Verhalten der Muskeleiweißkörper.

II. Mitteilung:

Isoelektrischer Punkt und Löslichkeit des Myosins.

Von

Hans H. Weber (Rockefeller-Stipendiat).

(Aus dem physiologischen Institut der Universität Rostock.)

(Eingegangen am 25. März 1925.)

Mit 4 Abbildungen im Text.

Inhalt.

Allgemeiner Teil.

I. Die älteren Untersuchungsergebnisse.

Seit etwa 30 Jahren ist es nicht mehr versucht worden, die einzelnen Fraktionen des Muskels voneinander zu trennen und ihre Eigenschaften in reinem Zustande zu untersuchen. So kommt es, daß man heute nicht sicher sagen kann, ob ein so wichtiges Organ wie der quergestreifte Muskel außer dem Myogen und seinen Umwandlungsprodukten (s. erste Mitteilung) einen weiteren Eiweißkörper „sui generis“ enthält.

Allerdings hat *O. v. Fürth* in seiner grundlegenden Arbeit (1895)[1]) einen weiteren selbständigen Eiweißkörper, das Myosin, isoliert. Er beschreibt ihn als lyophob, d. h. er flockt bei schwach saurer Reaktion und ebenso durch Dialyse und niedere Ammonsulfatkonzentrationen

---

[1]) *O. v. Fürth,* Arch. f. d. exper. Pathol. u. Pharm. **36**, 231, 1895.

etwa 23 bis höchstens 29 Proz. Seine Koagulationstemperatur beträgt nach *Fürth* bei raschem Erhitzen 45 bis 52°. Mit dem Myogen gemeinsam hat er nach diesem Autor die elementarchemische Zusammensetzung bis auf Bruchteile von Prozenten und die Neigung zu denaturieren. Das Denaturierungsprodukt nennt *Fürth* Myosinfibrin. Geringere Dispersität des Myosins gegenüber dem Myogen dokumentiert sich in einer leichten Opaleszenz, während reine Myogenlösungen goldklar sind. Diese Beobachtung über den Dispersitätsgrad haben viel später *Botazzi* und *Quagliariello*[1]) mit dem Ultramikroskop bestätigt. Sie fanden im Muskelpreßsaft zahlreiche Granula, deren Fällungsbedingungen den von *Fürth* für das Myosin gefundenen entsprachen und die sie deshalb mit diesem Protein identifizierten. Ein zweiter im Preßsaft enthaltener Eiweißkörper war mit dem Ultramikroskop nicht optisch auflösbar. Sie nannten ihn Myoprotein und betrachteten ihn als wesensgleich mit *Fürths* Myogen. Neue Gesichtspunkte zur chemischen Charakterisierung brachten die Untersuchungen nicht.

So gelten für alle bisherigen Befunde jene Bedenken, die *Fürth*[2]) selbst bereits bei der Aufstellung des Myosinbegriffs kamen: Er sah, daß das lyophobe Myosin zwar von dem lyophilen Myogen sehr verschieden war, nicht aber von seinen weniger stabilen Umwandlungsformen; so flockt z. B. das lösliche Myogenfibrin unter genau denselben Bedingungen spontan wie das Myosin. Wenn er das Myosin trotzdem als einen Eiweißkörper „sui generis" ansah, so tat er dies, weil er auch in einer alternden, langsam denaturierenden Myogenlösung nie eine Fällung zwischen 45 und 50° fand. Das war aber die Temperatur, bei der seine Myosinlösungen flockten. Das lösliche Myogenfibrin fiel bereits bis 40° aus, das Myogen erst über 50°. In seiner letzten Veröffentlichung über diesen Gegenstand ist *Fürth*[3]) von dieser hohen Bewertung der Koagulationstemperatur zurückgekommen, er möchte nicht mehr mit „der gleichen Entschiedenheit" behaupten, daß Myosin und etwa lösliches Myogenfibrin trotz der Verschiedenheit ihrer Fällungstemperatur nicht untereinander identisch seien.

Dieser Verdacht, daß das Myosin im Grunde gar nichts anderes ist als ein Derivat des Myogens, gewinnt an Gewicht durch die *Fürth* noch nicht so genau bekannte Mannigfaltigkeit der Denaturierungsformen, über die in der ersten Mitteilung[4]) dieser Untersuchungen berichtet ist. Von ausschlaggebender Bedeutung in dieser Frage ist aber eine zweite dort festgestellte Tatsache: Konzentrierte Myogenlösungen,

---

[1]) *Botazzi* und *G. Quagliariello*, Arch. intern. de physiol. **12**, 234 und 289 1912.
[2]) *O. v. Fürth*, Arch. f. d. exper. Path. u. Pharm. **36**, 231, 1895.
[3]) Derselbe, Ergebn. d. Physiol. **17**, 382, 1919.
[4]) *H. H. Weber*, diese Zeitschr. **158**, 443, 1925.

deren untere Flockungsgrenze überhaupt je nach den Bedingungen sehr variabel ist, beginnen mit 9 Proz. NH_4Cl bereits bei 45° zu koagulieren, d. i. aber die Fällungstemperatur der *Fürth*schen, 10 Proz. NH_4Cl enthaltenden Myosinlösungen. Damit findet sich das einzige, angeblich dem Myosin allein zukommende Merkmal, die charakteristische Koagulationstemperatur, auch bei der Denaturierung des Myogens wieder; ein bündiger Beweis für die Sonderexistenz des Myosins existiert damit nicht mehr.

II. Isolelektrischer Punkt und Flockungsoptimum der Fürthschen „Myosin"-Lösungen.

Einige orientierende Versuche ergaben: In „Myosinlösungen", die nach der Vorschrift von *Fürth*[1]) hergestellt sind, kann dieses Protein nicht einwandfrei als Eiweißkörper „sui generis" charakterisiert werden. Dieses Myosin erhält man aus sorgfältig ausgewaschener Dialysefällung durch Lösung in höheren Salzkonzentrationen oder durch mehrfache Umfällung aus dem Preßsaft mit 23proz. $(NH_4)_2SO_4$ und Lösung der Flockung durch Verdünnen. So wurden Myosinstammlösungen in NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$, Na-Acetat dargestellt, die — wie *Fürth* verlangt — restlos zwischen 45 und 52° flocken. Die Eiweißkonzentration war darin so gering, daß an ihnen nur die Lage des Flockungsoptimums und des isoelektrischen Punktes bestimmt werden konnte. (Für die Feststellung anderer Eigenschaften, z. B. der Quellungsfähigkeit, sind größere Eiweißmengen nötig.) Über die Ergebnisse an einigen Lösungen gibt Tabelle I Auskunft.

Tabelle I. Kaninchen-Myogenlösungen nach *Fürth*. Flockungsoptimum und Wanderungsumschlag der Flocken.

Herstellungsverfahren	Zusammensetzung der		Fällungsoptimum bei p_H	Kataphorese bei p_H
	Stammlösung	Lösungen v. variiertem p_H		
Dialyse	m/2 (4 proz.) Na-Acetat, p_H 7,0	0,18 mol. Acetat	5,0	5,35 anod. 5,0 kath.
„	0,35 mol. (2,8 proz.) Na-Acetat in 0,5 mol. (2,7 proz.) NH_4Cl p_H 7,0	0,1 mol. Na-Acetat in 0,17 mol. NH_4Cl	4,4	5,35 anod. 5,0 kath.
„	1,9 mol. (10 proz.) NH_4Cl p_H etwa neutral	m/120 Na-Acetat in 0,9 mol. NH_4Cl	saurer als 3,6	— —
Ammonsulfatfällung	m/62 (1/4 proz.) $(NH_4)_2SO_4$ p_H etwa neutral	m/130 Na-Acetat in m/120 $(NH_4)_2SO_4$	4,7—4,2	5,1 anod. 4,7 kath.
Dialyse	m/13 (1 proz.) $(NH_4)_2SO_4$ p_H neutral	m/120 Na-Acetat in m/26 $(NH_4)_2SO_4$	4,3	5,4 anod. 5,0 ? 4,7 kath.

Die letzte Spalte zeigt, daß der Umschlag der Wanderung mit einiger Streuung um p_H 5 herum erfolgt, genau wie für jene Myogenfibrinflocken, die durch Anionenwirkung aus einer reinen Myogenlösung ausfallen (siehe

[1]) *O. v. Fürth*, Arch. f. d. exper. Pathol. u. Pharm. **36**, 231, 1895.

erste Mitteilung, III). Gegenüber dieser Art von Myogenflockung zeigt die Fällung *Fürth*scher Myosinlösungen auch in der Lage ihres Flockungsoptimums bei Gegenwart derselben Anionenkonzentrationen keine wesentlichen Unterschiede. Dies zeigt Tabelle II.

Tabelle II.

Fällungsoptimum des Myogens		Fällungsoptimum des Myosins	
in	bei p_H	in	bei p_H
m/50 (Na)-Acetat	5,2	m/6 (Na)-Acetat	5,0
m/25 (Na)Cl	5,15	m/6 $(NH_4)Cl$	4,4
m/1,25 (Na)Cl	saurer als 3,6	m/1,1 $(NH_4)Cl$	saurer als 3,6
m/100 $(Na_2)SO_4$	4,7	m/120 $(NH_4)_2SO_4$	4,7—4,2
m/17,5 $(Na_2)SO_4$	4,15	m/26 $(NH_4)_2SO_4$	4,3

Daß Ammonsulfat das Flockungsoptimum stark nach der sauren Seite verschiebt, macht *Granströms*[1]) Angabe verständlich, der isoelektrische Punkt des Myosins liege bei p_H 4. Diese aus der Lage seines Flockungsoptimums gezogene Folgerung ist irrig, da seine Lösungen von der Ammonsulfatfällung her SO_4''-haltig waren.

Es ergibt sich also, daß in den beiden Eigenschaften, die man an den eiweißarmen *Fürth*schen Myosinlösungen einzig feststellen kann, Flockungsoptimum und isoelektrischer Punkt der Flocken in verhältnismäßig hochkonzentrierten Salzlösungen oder aber Lösungen spezifisch besonders wirksamer Salze $[(NH_4)_2SO_4]$, kein klarer Unterschied gegenüber dem entsprechenden Verhalten des Myogens besteht.

III. Das Verhältnis der Basen- zu der Säuredissoziationskonstante.

Die $H^{\cdot}$-Konzentration, bei der Eiweiß elektrisch ungeladen ist, d. h. die Lage seines isoelektrischen Punktes hängt von der Struktur seines Moleküls ab, nämlich von dem Größenverhältnis seiner Säure- zu seiner Basendissoziationskonstante. Diese C_H wird in ihrem Betrage verändert, wenn ein zweiter Faktor zur Geltung kommt, wenn das Protein an seiner Grenzfläche vorzugsweise Salzionen einer bestimmten elektrischen Ladung adsorbiert. Die Größe dieser Adsorption und damit Verschiebung des isoelektrischen Punktes hängt ab von der spezifischen Natur und Konzentration dieser Salzionen[2]). Damit diese Adsorption stattfindet, muß für die meisten — spezifisch nicht besonders wirksamen — Puffersalze die Konzentration ziemlich hoch sein. Hält man also die Konzentration niedrig, so schaltet man die Ladungsänderung durch Salzadsorption praktisch aus und findet diejenige Lage des isoelektrischen Punktes, die sich aus der inneren Konstitution des Eiweißmoleküls ergibt. Gerade diese ist aber eine

[1]) *K. O. Granström*, diese Zeitschr. 134, 589, 1923.

[2]) *Jaques Loeb*, Die Eiweißkörper usw., S. 258. Berlin, Julius Springer. 1924.

für die Charakterisierung des betreffenden Proteins grundlegende Konstante. *Fürth*sches Myosin ist in Salzen gelöst, die durch ihre Konstitution oder spezifische Natur wirksam sind; es zeigt darin dieselbe Lage des Flockungsoptimums und des isoelektrischen Punktes der ausgefallenen Flocken bei p_H 5, wie das unter genau den gleichen Bedingungen ausgeflockte Myogenfibrin (s. S. 470). Von diesem Myogenfibrin ist aber bewiesen, daß die Lage seines Wanderungsumschlags in der Gegend p_H 5 mitbestimmt ist durch Anionenadsorption. Hängt der isoelektrische Punkt allein von der inneren Konstitution des Myogenfibrins ab, so liegt er bei p_H 6,3 (s. erste Mitteilung, III). Mit diesem „wahren" isoelektrischen Punkt, der für das Myogen und alle seine Derivate derselbe ist, hätte man den „wahren" isoelektrischen Punkt des Myosins oder überhaupt jeden Muskeleiweißkörpers zu vergleichen, um ein Urteil über seine selbständige Existenz zu gewinnnen. Diese muß anerkannt werden, wenn die Lage beider Punkte nicht dieselbe ist. Der „wahre" isoelektrische Punkt des Myosins ergibt sich aus der Beobachtung der Kataphorese in indifferenten Salzlösungen geringer Konzentration. Solche Überführungsbedingungen sind von den eiweißarmen, salzreichen *Fürth*schen Myosinstammlösungen aus kaum herzustellen.

Es wurde daher ein anderer Weg eingeschlagen: Es wurde untersucht, ob sich aus dem Muskel ein Eiweißkörper isolieren läßt, der sich durch die Lage seines „wahren" isoelektrischen Punktes wie seine sonstigen Eigenschaften als selbständiges Protein ohne genetische Beziehungen zum Myogen erweist.

Als Ausgangsmaterial für eine derartige Fraktion empfahl sich die Dialysefällung nicht, da diese während ihres langsamen Entstehens auch eine Menge Myogenfibrin aufnimmt, wohl aber der beim Auspressen des Muskelsafts im Koliertuch bleibende Rückstand. Es war auf Grund der Feststellungen über die Stabilitätsbedingungen des Myogens (s. erste Mitteilung, III bis V) nicht anzunehmen, daß der Preßrückstand wesentliche Mengen Myogenfibrin enthält: Es war keine beträchtliche Myogenfibrinbildung durch Altern des Myogens zu erwarten, da das Auspressen höchstens wenige Stunden nach dem Tode des Versuchstieres beendet war. Eine Entionisierungsfällung kommt ebenfalls kaum in Frage. Die Annäherung an den isoelektrischen Punkt von der alkalischen Seite umfaßt ein zu kleines p_H-Intervall. und die Säuerung über ihn hinaus erfolgt durch die im Muskel gebildete Milchsäure ohne Reaktionsschwankungen vollkommen kontinuierlich (s. dazu erste Mitteilung, VI). Diese Säuerung geht bis p_H 6 bis 5,8, eine wesentliche Myogenfibrinbildung durch die physiologischen, verhältnismäßig indifferenten Anionen ist aber erst von p_H 5,5 ab nach der sauren Seite zu erwarten (s. erste Mitteilung, III). Es war also anzunehmen, daß der Preßrückstand, der durch gründliches Waschen von den letzten Spuren

genuinen Myogens befreit war, einen vom Myogenfibrin verschiedenen Eiweißkörper in ziemlich reiner Form enthält.

Der „wahre" isoelektrische Punkt dieses Eiweißkörpers, der allein von der inneren Konstitution seines Moleküls abhängt, wird bestimmt, indem alle seine Lage modifizierenden, adsorbierten Salzionen durch Waschung entfernt werden. Damit dies sicher erreicht sei, wurde der mit Quarz zu einer rahmigen Suspension zerriebene Preßrückstand ausgewaschen, bis das Waschwasser eine Leitfähigkeit von $\Lambda = 2$ bis 5×10^{-5} zeigte, und dann 1 bis 3 Tage in Wasser dieser Leitfähigkeit gehalten[1]). Solche Suspensionen wandern in m/100 Acetat bei p_H 5,3 und alkalischer anodisch, bei p_H 5,0 und saurer kathodisch (Belege s. Experimenteller Teil B, a bis c). Dagegen zeigt das einzige Myogenderivat, das zu Verwechselungen Anlaß geben könnte (s. oben), das Anionenmyogenfibrin, unter solchen Umständen bei p_H 6,3 den Umschlag seiner elektrischen Wanderung. Der „wahre" isoelektrische Punkt des Muskeleiweißkörpers des Preßrückstandes liegt bei p_H 5,1 bis 5,2. Er ist damit als selbständiges Protein erwiesen. Da dieses, wie sich später ergeben wird, identisch mit dem Eiweiß gewisser *Fürth*scher „Myosinlösungen" ist, soll es weiterhin Myosin genannt werden.

Daß der gefundene isoelektrische Punkt bei 5,1 bis 5,2 durch Ionenadsorption aus den verdünnten Puffern gänzlich unbeeinflußt ist, wurde an Lösungen dieses Eiweißkörpers kontrolliert; deren Wanderungsumschlag bei dem angegebenen p_H ist in Puffergemischen von m/50, m/100, m/150 Acetat, m/100 Phosphat unabhängig von der Konzentration der Salzionen (Belege s. Experimenteller Teil A).

Aus solchen Lösungen flockt außerdem das Eiweiß von p_H 5,0 bis 5,5 in wenigen Minuten quantitativ. Es ist also lyophob. Auch hierin unterscheidet sich sein Verhalten von dem einer Myogenlösung. In dieser tritt bei so niedriger Konzentration der verhältnismäßig indifferenten Puffersalze bei p_H 5 meist überhaupt keine Fällung ein, oder wenn doch, so umfaßt sie nur einen minimalen Bruchteil des Myogens.

Aus dem Preßrückstand entstanden die Myosinlösungen, mit denen diese Versuche angestellt wurden, spontan: Beim Waschen verschiebt sich die Reaktion von etwa p_H 6 (s. oben) nach p_H 7 bis 7,5, wodurch sich beträchtliche Proteinmengen lösen. Aus dem Preßsaft — und zwar von Rana esculenta — wurde das Myosin nach einem in der ersten Mitteilung angegebenen Verfahren isoliert und (salzfrei!) in verdünnter NaOH bei

[1]) Die geschilderte Waschung ist, um ganz sicher jede Anionenadsorption zu beseitigen, wahrscheinlich viel gründlicher vorgenommen, als nötig. Jedenfalls zeigen durch Anionenwirkung gefällte Myogenfibrinflocken, deren Wanderungsumschlag bei p_H 5 liegt, bereits nach wenigen Waschungen wieder ihren „wahren" isoelektrischen Punkt bei p_H 6,3.

p_H etwa 8 gelöst (Einzelheiten s. Experimenteller Teil, A, 2). Die nicht unbeträchtliche Proteinkonzentration in beiden Arten der Myosinlösung gestattet die mühelose Prüfung des quantitativen Ablaufs der Fällung durch Sulfosalicylsäurezusatz zum Filtrat. Die *Fürth*schen Myosinlösungen waren dagegen so wenig eiweißhaltig, daß auch bei günstigem p_H nur eine sehr verzögerte und schwache Trübung entsteht, so daß man über den quantitativen Verlauf der Fällung bei ihnen nur schwer etwas aussagen kann. Die geringsten Verunreinigungen, die nicht mitflocken, machen dann ein Urteil überhaupt unmöglich.

Das Myosin ist mithin sowohl beim Kaninchen (aus dem Preßrückstand) wie Rana esc. (aus dem Preßsaft) ein Eiweißkörper „sui generis" mit einem „wahren" isoelektrischen Punkt bei p_H 5,15. Es ist lyophob, d. h. es flockt bei jeder elektrischen Entladung (auch einer solchen durch $H^{\cdot}$ und OH') quantitativ. Das Flockungsoptimum deckt sich mit dem isoelektrischen Punkt, wenn nur indifferente Salze in nicht allzu hohen Konzentrationen vorhanden sind (s. dazu aber diese Mitteilung, IV).

IV. Ionisation und Löslichkeit.

Die Kräfte, die einen Eiweißkörper (bzw. allgemein ein Kolloid) gegen sein Agglutinations- und Sedimentationsbestreben in Lösung bringen oder darin erhalten, sind die elektrische Abstoßung seiner gleichsinnig geladenen Teilchen und seine Affinität zum Lösungsmittel, seine Lyophilie. Diese Kräfte wirken einer engen Aneinanderlagerung der Eiweißteilchen entgegen. In einer Lösung erschwert ihr Anwachsen mehr und mehr die Flockung und erhöht damit die Flockungstemperatur, einen Niederschlag macht es lockerer und wasserreicher und vergrößert so sein Quellungsvolumen (s. darüber auch unten: *Donnan*gleichgewicht). Variiert man die Versuchsbedingungen, so daß eine der beiden fraglichen Kräfte konstant bleibt, z. B. die Lyophilie, so gibt der Gang der Flockungstemperatur und der Quellung qualitativ den Gang der anderen Kraft, also der elektrischen Abstoßung der Teilchen wieder. Diese Bedingung ist dann im Sinne dieses Beispiels annähernd erfüllt, wenn man in sehr verdünnten Lösungen indifferenter Puffersalze nur den p_H ändert. In diesem Falle hängt [*Jaques Loeb*[1])] die Größe der elektrischen Ladung eines Proteins im wesentlichen von seiner Dissoziation als Ampholyt ab[2]).

Auf das Quellungsvolumen wirkt die Dissoziation des Proteins nicht nur durch größere oder geringere Auflockerung je nach der elektrischen Ladung der Partikel; letztere schafft außerdem einen *Donnanschen Quellungsdruck* osmotischer Natur. Er braucht in diesem Zusammenhang nicht

---

[1]) *Jaques Loeb*, a. a. O.

[2]) Dagegen nicht oder höchstens unwesentlich von Adsorptionspotentialen.

weiter gesondert betrachtet zu werden, da er unter den angegebenen Bedingungen — bei Konstanz der gesamten Elektrolytkonzentration — mit steigender Eiweißionisation immer im Sinn einer Quellungssteigerung wirkt, genau wie die elektrischen Abstoßungskräfte. Dazu tritt er bei Anwesenheit hoher Salzkonzentrationen ganz hinter den Kräften zurück, die die Kohäsion beeinflussen.

Die Quellungskurve einer Myosinsuspension der Abb. 1 und die Koagulationstemperaturkurve einer Lösung der Abb. 2 zeigen in ihrem Verlauf weitgehende Ähnlichkeit, da beide, wie ausgeführt, durch die Ionisation in ihrer Gestalt bestimmt werden.

Die Suspension wurde in der oben beschriebenen (s. S. 462) Weise aus dem Preßrückstand von Kaninchenmuskeln erhalten. Die Quellung

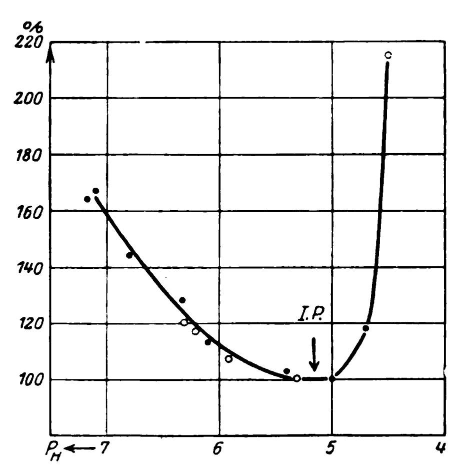


Abb. 1. Quellung des Preßrückstandes vom Kaninchenmuskel in m/100 Phosphat-Acetat. o—o—o o Versuch a, exper. Teil B. ·—·—· Versuch b, exper. Teil B. I. P. = isoelektr. Punkt.

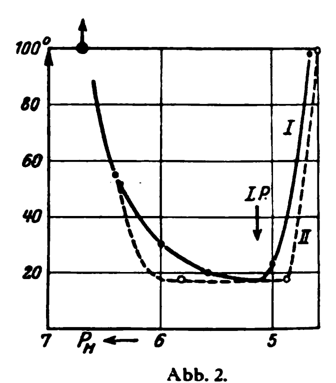


Abb. 2. Koagulationstemperatur einer Myosinlösung von Rana esc. in m/100 Phosphat. ·—·—·—· Kurve I, Flockung 1½ Min. nach Mischung von Puffer und Stammlösung. ---o---o--- Kurve II, 2 Stunden nach Mischung. I. P. = isoelektrischer Punkt.

selbst wurde vorgenommen in m/100 Phosphat-Acetat. Es genügt eine Quellungsdauer der durchgeschüttelten Suspension von ½ Stunde. Dann wurde das Eiweiß 10 Minuten mit einer Tourenzahl von 2000 pro Minute zusammenzentrifugiert. Die Quellung ist angegeben in Prozenten des Volumens am isoelektrischen Punkt. Die Methode gibt recht gut reproduzierbare Resultate bei p_H 7 bis 4,7. Bei saurerer und alkalischerer Reaktion geht das Eiweiß in beträchtlichem Umfang in Lösung (Einzelheiten vgl. Experimenteller Teil, B.). Zu den Fällungsversuchen der Abb. 2 wurde die Stammlösung nach dem in dieser Mitteilung III erwähnten Verfahren aus Preßsaft von Rana esculenta hergestellt. Die Flockung fand in m/100 Phosphat statt. Als Koagulationstemperaturen sind die Gradzahlen in Celsius eingezeichnet, bei denen die Lösung 1½ Minuten nach Mischung des Eiweißes mit den Puffern flockt[1]).

[1]) Sobald solche Flockung eintritt, umfaßte sie — wenigstens bei den hier verwendeten Eiweißkonzentrationen — im Gegensatz zum Myogen immer alles Protein (s. dazu Experimenteller Teil, z. B. C.).

Beide Methoden geben übereinstimmend dasselbe Bild der Ionisation des Myosins. Ihr Minimum liegt um den isoelektrischen Punkt bei p_H 5,2 herum; sie wächst auf seiner sauren Seite sehr rasch (schon bei etwa p_H 4,5 ist das Quellungsvolumen annähernd doppelt so groß wie am isoelektrischen Punkt, die Lösung bei 100° eben noch flockbar). Auf der alkalischen Seite steigen die Kurven der Quellung wie der Fällungstemperatur zunächst sehr allmählich, von p_H 6 dagegen ebenfalls steil an. Demnach scheint die Ionisation bis p_H 6 gering zu sein. Dies bestätigt auch Kurve II, Abb. 2. Steht das Myosinpuffergemisch vor dem Erwärmen 2 Stunden, so flockt während dieser Zeit das Eiweiß von p_H 5 bis 6 bereits bei Zimmertemperatur, während außerhalb dieses Intervalls die Koagulationstemperatur dadurch kaum beeinflußt wird. Dagegen wächst die Dissoziation des Myosins sehr rasch an, sobald die C_H kleiner als 10^{-6} wird, so daß dieser Eiweißkörper bei p_H 7 oder etwas alkalischer bereits zu einem beträchtlichen Teil als Alkalieiweiß vorliegen dürfte im Gegensatz zum Myogen und den meisten anderen Proteinen[1]).

Der hier angenommene Gang der Reaktion zwischen Myosin und Alkali würde weitgehend dem entsprechen, was *Meyerhof*[2]) von der Ermüdungssubstanz des Muskels fordern muß. Da der *Meyerhof*sche Selbststeuerungs-p_H der Milchsäurebildung (s. erste Mitteilung) in der Gegend p_H 6 liegt, so wird das Myosin nie völlig entionisiert, wohl aber so weitgehend, daß es keine nennenswerten Alkalimengen mehr festhält und so der Reaktion mit der Milchsäure entzieht.

Solange aber die Funktion der Proteine im Muskel nicht genau bekannt ist, muß man auch die andere Möglichkeit im Auge behalten, daß das Myosin die Verkürzungssubstanz ist. Wenn auch die Lage des isoelektrischen Punktes des Myogens[3]) derjenigen näherkommt, die *Meyerhof* für seine Verkürzungssubstanz gefordert hat, so entspricht doch eine Eigenschaft des Myosins den *Hill-Meyerhof*schen Anschauungen von der Funktion ihres Kontraktionskörpers besser. Als lyophober Eiweißkörper flockt (bzw. gerinnt) es tatsächlich bei Entionisierung, wie es diese Kontraktionstheorie verlangt. Das lyophile Myogen aber tut das nicht oder nur unter Denaturierung, also nicht in glatt reversibler Weise[3]). Dies gilt wenigstens für jene relativ dünnen Konzentrationen, in denen man die Eiweißkörper rein darstellen kann.

---

[1]) Auch diese Eigentümlichkeit seiner Ionisation erweist das Myosin als selbständiges Muskelprotein (vgl. dazu erste Mitteilung, Abb. 4, die Quellungskurve eines Myogenfibrins, das genau so vorbehandelt ist wie hier der Preßrückstand).

[2]) *O. Meyerhof*, z. B. Naturwissenschaften, 12. Jahrg., 1924. S. 1137.

[3]) Siehe diese Zeitschr., erste Mitteilung.

Während die bisher diskutierten Kurven durch den Ionisierungsgrad des Myosins bestimmt waren, ist das nicht mehr der Fall bei Gegenwart hoher Salzkonzentrationen. Untersucht wurde der Einfluß von NH_4Cl, das nach den Angaben der Literatur[1]) ein sehr gutes Lösungsmittel für Muskeleiweißkörper sein soll, es aber für Myogenfibrin nicht ist.

Zu den in m/100 Phosphat-Acetat gequollenen Myosinproben der Kurve I, Abb. 3[2]) wurde so viel NH_4Cl hinzugegeben, daß eine 5proz. Lösung resultierte, aufgerührt und durchgeschüttelt und sofort wieder in der oben angegebenen Weise zusammenzentrifugiert. Die dann erhaltenen Quellungsvolumina gibt Kurve II der Abb. 3. Ihrer Besprechung muß vorausgeschickt werden, daß alle Quellungsvolumina außer dem bei p_H 4,5 etwas zu klein sind, weil von p_H 5,3 nach der alkalischen Seite — im Gegensatz zu den Versuchen ohne NH_4Cl — sofort beträchtliche Eiweißmengen in Lösung gehen. Das Volumen bei p_H 4,5 erscheint dagegen etwas zu groß: Das Myosin bildet bei diesem p_H unter NH_4Cl-Wirkung grobe Gerinnsel, die sich nicht glatt und lückenlos aufeinanderlegen (siehe dazu Experimenteller Teil B, c).

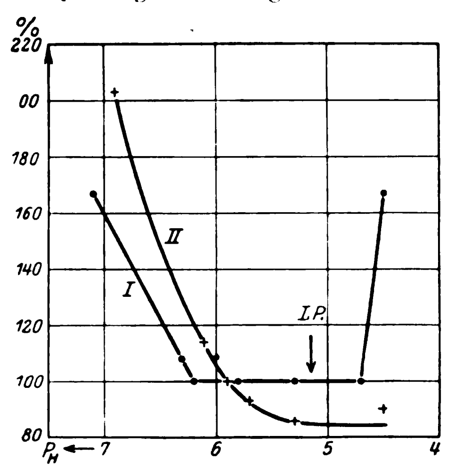


Abb. 3. Quellung des Preßrückstandes vom Kaninchenmuskel. Kurve I in m/100 Phosphat-Acetat. Kurve II ebenso + 5 Proz. NH_4Cl. I. P. = isoelektr. Punkt (s. exper. Teil B, c).

Beim Vergleich der Kurven fällt auf, daß die am NH_4Cl-freien Myosin zu beobachtende Säurequellung (Kurve I) durch den NH_4Cl-Zusatz gänzlich unterdrückt ist. Ob dies — etwa analog den Verhältnissen beim Myogen — zum Teil auf einer Verlagerung des isoelektrischen Punktes nach der sauren Seite beruht, ist durch elektrische Überführung wegen der hohen Salzkonzentration nicht zu kontrollieren. Sicher hat dagegen bei p_H 5 durch das NH_4Cl eine Minderung der Lyophilie — oder in diesem Falle besser: eine Steigerung der Lyophobie stattgefunden. Sie dokumentiert sich 1. im Absinken des Quellungsvolumens *unter* den isoelektrischen Wert der salzarmen Kurve I und II 2. in dem grobklumpigen Festwerden des vorher fein dispersen Niederschlags. Dagegen zeigt von etwa p_H 6 an nach der alkalischen Seite

[1]) Siehe z. B. Handbuch d. Biochemie d. Menschen u. d. Tiere von *C. Oppenheimer*, 2, [II], 248.

[2]) Das Fehlen jeder Quellung zwischen p_H 5 und 6 beruht hier darauf, daß das Myosin bei seiner Präparation lange auf isoelektrischer Reaktion gehalten wurde. Damit scheint eine Verminderung seiner Reaktionsfähigkeit verbunden zu sein (vgl. Kurve II der Abb. 2 und 4).

Kurve II eine doppelt so große Zunahme des Eiweißvolumens wie Kurve I[1]). Diese Quellungszunahme kann nicht auf einem Anwachsen des *Donnan*schen Quellungsdrucks beruhen. Er ist bei so hohen Salzkonzentrationen immer praktisch gleich Null. Sie ist hervorgerufen worden durch eine Löslichkeitssteigerung des Proteins. Dies zeigt auch das Experiment: Wurde nämlich das Eiweiß noch einmal aufgerührt und erst nach 12 Stunden wieder zusammenzentrifugiert, so war das zusammenzentrifugierbare Myosinvolumen weniger als halb so groß wie vorher. Dafür erstarrte die überstehende Flüssigkeit zu einer käsigen Gallerte auf Sulfosalicylsäurezusatz. Der so nachgewiesene Gehalt der überstehenden Flüssigkeit an löslich gewordenem Eiweiß nahm von p_H 6,9 nach der sauren Seite rasch ab und war bei p_H 5 etwa ebenso niedrig wie ohne NH_4Cl (s. Experimenteller Teil B, c).

Diese Löslichkeitserhöhung kann theoretisch beruhen auf einer Vermehrung der elektrischen Aufladung der Myosinpartikel durch NH_4Cl oder auf Vergrößerung ihrer Affinität zum Wasser. Die Entscheidung hierüber ergibt sich aus dem Vergleich der Quellungskurve mit der Koagulationstemperatur (Abb. 4).

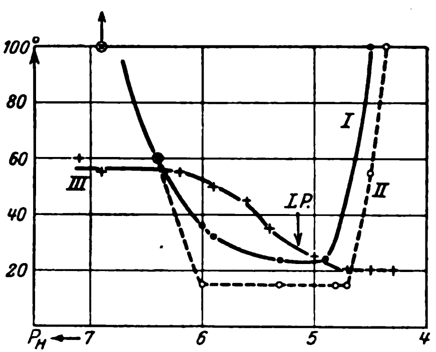


Abb. 4. Koagulationstemperatur einer Myosinlösung vom Kaninchen in m/120 Phosphat. — · — · — · · Kurve I. Flockung 2 Min. nach Mischung von Puffer und Stammlösung. + · + — + Kurve III, ebenso + 8 Proz. NH_4Cl. o · · · o · · · o · · Kurve II. in m/120 Phosphat 2 Stunden nach Mischung. I. P. = isoelektrischer Punkt.

Spontan aus Preßrückstand in Lösung gegangenes Myosin (siehe III. dieser Mitteilung) wurde für die Versuche der Kurven I und II der Abb. 4 unter den gleichen Bedingungen durch Erhitzen geflockt wie für die entsprechenden Kurven der Abb. 2. Nur betrug hier die Erwärmungsdauer bis zur Flockung 2 Minuten. Diese Kurven der beiden Abbildungen stimmen innerhalb der Fehlergrenzen überein. Frosch- und Kaninchenmyosin erscheinen identisch (siehe dazu auch III). Kurve III aus derselben Stammlösung unterscheidet sich in ihrer Zusammensetzung nur durch ihren Gehalt an 8 Proz. NH_4Cl. Die zeitlichen Bedingungen waren dieselben wie bei Kurve I, 2 Minuten von der Mischung bis zur Flockung (siehe dazu Experimenteller Teil, C.).

Der Vergleich der Kurven III und I zeigt: Bei p_H 6,8 trägt das Myosin in salzarmer Lösung eine so hohe elektrische Ladung, daß dieser

[1]) So resultiert in konzentrierten Salzlösungen eine Verschiebung des Quellungsminimums nach der sauren Seite, die vielleicht die Ursache sein dürfte für *Quagliariellos* Angabe, dieses liege bei p_H 4,7. Er identifiziert es mit dem isoelektrischen Punkt. Arch. di Science Biol. **5**, 443, 1924.

an sich lyophobe, außerdem durch das Erhitzen vermutlich weiter denaturierte Eiweißkörper nicht mehr flockt. Dagegen findet in 8 Proz. NH_4Cl die Koagulation unter denselben Versuchsbedingungen bereits bei 56° statt, und zwar über p_H 7 hinaus. Die elektrische Ladung ist also in diesem Falle weitgehend vernichtet. Wenn trotzdem die Löslichkeit erhöht ist, wie oben gezeigt wurde, so beruht dies also ausschließlich auf einer Erhöhung der Lyophilie wahrscheinlich durch Bildung einer undissoziierten NH_4- oder NH_4Cl-Myosinverbindung.

Die so nachgewiesene Lyophilie des NH_4Cl-Myosins, nicht etwa eine erhöhte elektrische Ladung in dem p_H-Intervall 6 bis 5, dürfte auch die Ursache sein, daß dort die Koagulationstemperaturkurve III über der Kurve I liegt: Ein lyophiles Eiweiß (oder Eiweißverbindung) muß auch in beinahe oder ganz entladenem Zustande erst durch Erwärmung auf seine Denaturierungstemperatur (in diesem Falle: wieder) lyophob gemacht werden, ehe es flockt. Infolgedessen senkt sich die Fällungstemperatur erst bei einem p_H (etwa 5) auf Zimmertemperatur, bei dem der fördernde Einfluß des NH_4Cl auf die Lyophilie aufhört (vgl. die Diskussion der Quellungskurve II, Abb. 3, S. 482). Man kann also aus der Verlagerung der Koagulationstemperaturkurve in 8 Proz. NH_4Cl genau so wenig wie aus der gleichsinnigen Verschiebung der Quellungskurve (Abb. 3) eine entsprechende Änderung des isoelektrischen Punktes ohne kataphoretische Untersuchung erschließen.

Es bleibt nun noch festzustellen, mit welcher Berechtigung für den in dieser Mitteilung charakterisierten Eiweißkörper der Name Myosin aus den *Fürth*schen Untersuchungen übernommen worden ist. Daß der *Fürth*sche Eiweißkörper mit dem hier besprochenen die Lyophobie gemeinsam hat, genügt angesichts derselben Eigenschaft bei den Umwandlungsprodukten des Myogens nicht zur Identifizierung (s. diese Mitteilung, I). Dagegen scheint die an dem oben charakterisierten Protein festgestellte Löslichkeit in NH_4Cl beim Myogenfibrin nicht in gleicher Weise vorzukommen (s. erste Mitteilung, Abb. 4). Die von älteren Untersuchern festgestellte lösende Wirkung dieses Salzes auf die Muskeleiweißkörper beruht demnach auf seiner entsprechenden Wirkung allein auf das Myosin. Obwohl *Fürth*[1]) dies nicht ausgesprochen hat, hat er sich doch diese Tatsache zunutze gemacht: Er hat aus den zusammengesetzten Dialyseniederschlägen des Muskelpreßsafts sein Myosin isoliert durch Lösung in konzentrierten Salzlösungen, und zwar vorzugsweise in NH_4Cl.

Somit dürften wenigstens seine NH_4Cl-Lösungen das besprochene Protein annähernd rein enthalten. Dafür spricht auch die von diesem Autor angegebene Koagulationstemperatur von 45 bis 52°. Die Koagulationstemperaturkurve III der Abb. 4 liegt zwar in dem p_H-Intervall, das für *Fürths* Myosinlösungen in Frage kommt, 6 bis 7,2, einige Grade

---

[1]) *O. v. Fürth*, a. a. O., S. 236.

höher, nämlich bei 56^0; dies erklärt sich aber aus der sehr raschen Erwärmung unmittelbar nach der Eiweiß-NH_4Cl-Mischung. Wird die NH_4Cl-Proteinlösung statt dessen 10 Minuten auf 50 bis 52^0 erwärmt, so ist ihr Filtrat tatsächlich völlig eiweißfrei, wie *Fürth* verlangt.

Es ist also nur berechtigt, das Myosin mit diesem *Fürth*schen Namen zu benennen; jener Autor hat es isoliert in der Hand gehabt und unter seinen besonderen Versuchsbedingungen auch in seinen Eigenschaften richtig geschildert, wenn auch die mit den damaligen Mitteln mögliche Charakterisierung nicht genügt, um das Protein als ein solches „sui generis" einwandfrei sicherzustellen.

Den Einfluß der besonderen Bedingungen seiner Experimente hat *Fürth* freilich unterschätzt, wenn er die in NH_4Cl-Lösungen gefundene Koagulationstemperatur als allgemeingültig ansieht. Bei Berücksichtigung des Temperaturunterschieds der Flockung in 8 Proz. (etwa m/1,5) NH_4Cl und m/100 Phosphat (Abb. 4) muß es zweifelhaft erscheinen, ob der *Fürth*sche Wert der Flockung, z. B. für genuine Preßsäfte (Salzkonzentration: etwa m/10), auch nur annähernd gilt. Also auch von der Seite des Myosins bestehen ebenso wie von der des Myogens (s. erste Mitteilung) ernste Bedenken gegen die Zuverlässigkeit der Hitzekoagulationsmethode für die quantitative Trennung der Muskeleiweißkörper.

Anhang.

Außer dem Myogen und dem Myosin scheinen im Muskel von Kaninchen und Frosch keine Eiweißkörper in einer Menge vorzukommen, die ins Gewicht fällt. Daß der Preßrückstand im wesentlichen aus Myosin besteht, ist oben gezeigt. Im Gegensatz zu den Befunden von *Vlès* und *Coulon*[1]) wurden aber auch im Preßsaft keine anderen Umschlagspunkte der elektrischen Wanderung gefunden, als den beiden bisher charakterisierten Eiweißkörpern in reinem Zustande zukommen. Die im Preßsaft von Rana esc. spontan bei Säuerung ausfallenden Flocken schlagen in ihrer kataphoretischen Wanderung bei 5,1 bis 5,2 um. Filtriert man sie ab, so liegt der isoelektrische Punkt des übrigen Eiweißes bei p_H 6,0 (s. dazu Myogen von Rana esc., erste Mitteilung). Genuiner, verdünnter Kaninchenpreßsaft wandert bei p_H 5,0 rein kathodisch, bei 6,6 rein anodisch (Belege s. Experimenteller Teil, Anhang).

Zusammenfassung.

1. Der Vergleich der in der Literatur angegebenen Charakteristika des „Myosins" mit entsprechenden Eigentümlichkeiten der Dena-

---

[1]) *F. Vlès* et *A. de Coulon*, C. r. hebdom. des séances de l'acad. des sciences **197**, 82, 1924; Ber. über d. ges. Physiol. u. exper. Pharm. **29**, 26.

turierungsprodukte des Myogens (s. erste Mitteilung) ergibt, daß seine Existenz als selbständiger Eiweißkörper bisher nicht bewiesen war.

2. Das Flockungsoptimum nach *Fürth* hergestellter Myosinlösungen liegt bei p_H 5 oder saurer, je nach der Art und Konzentration der anwesenden Salze. Das Flockungsoptimum von Myogenlösungen desselben Salzgehalts liegt bei ungefähr demselben p_H. Auch der isoelektrische Punkt der Flocken ist in beiden Fällen identisch — bei etwa p_H 5. Diese Tatsachen sprechen also nicht für eine selbständige Stellung des Myosins.

3. Beim Myogen beruht aber die Flockung und Umladung der Flocken bei diesem p_H auf einer Anionenwirkung. Beseitigt man diese, so liegt der „wahre" isoelektrische Punkt jedes Myogenfibrins (vom Kaninchen) bei p_H 6,3. Mit diesem ist der „wahre" isoelektrische Punkt eines etwaigen Myosins zu vergleichen, wie man ihn unter Ausschluß von Salzionenwirkungen in stark verdünnten indifferenten Pufferlösungen findet. Diese Verhältnisse lassen sich von den salzreichen *Fürth*schen Stammlösungen aus nicht herstellen.

4. Dagegen zeigt der Preßrückstand von Kaninchenmuskeln, der beim Auspressen des Muskelpreßsaftes zurückbleibt, unter Bedingungen bei denen jedes Myogenfibrin seinen isoelektrischen Punkt bei 6,3 hat, seinen Umladungspunkt bei 5,1 bis 5,2. Er ist damit als Eiweißkörper „sui generis" erwiesen.

5. Ein Protein mit demselben isoelektrischen Punkt wurde nach einem näher beschriebenen Verfahren auch aus dem Preßsaft von Rana esc. isoliert und gelöst. Diese Lösungen, genau wie solche aus dem Preßrückstand des Kaninchens, flocken spontan und quantitativ in einer Zone um p_H 5,1 bis 5,2 herum. Dieser Eiweißkörper, dessen Identität bei Rana esc. und Kaninchen auch aus der Übereinstimmung der Koagulationstemperaturkurve bei beiden Tierarten hervorgeht, ist also lyophob.

6. Die Quellungs- und Fällungskurve gestatten gewisse Rückschlüsse auf die Abhängigkeit der Ionisation dieses Proteins vom p_H. Diese werden im Hinblick auf seine etwaige Funktion im Muskel erörtert.

7. NH_4Cl wirkt in höherer Konzentration auf der alkalischen Seite des isoelektrischen Punktes mit fallender C_H immer stärker lösend auf den besprochenen Eiweißkörper. Dies beruht nicht auf einer Erhöhung seiner elektrischen Ladung, sondern seiner Lyophilie. Dies wird aus dem Vergleich der NH_4Cl-Wirkung auf Quellung und Fällung gefolgert.

8. Da NH_4Cl ausschließlich Myosin löst, erscheint der Schluß berechtigt, daß auch die *Fürth*schen NH_4Cl-Myosinlösungen es rein enthalten haben. Dafür spricht ferner deren Koagulationstemperatur.

Es ist also zweckmäßig und berechtigt, den Namen Myosin beizubehalten.

9. Eine Gleichsetzung der Koagulationstemperatur in NH_4Cl und in verdünnten Lösungen indifferenter Salze ist nicht statthaft.

10. Im verdünnten Preßsaft werden keine anderen isoelektrischen Punkte gefunden, als dem Myogen und Myosin in reinem Zustand zukommen.

Die bisherigen Untersuchungen sind mit Hilfe einer Sachbeihilfe und eines Stipendiums der Rockefeller-Foundation ausgeführt, der ich dafür großen Dank schulde. Ebenso möchte ich dem Leiter des physiologischen Instituts, Herrn Professor *H. Winterstein* für sein freundliches, stets bereitwilliges Entgegenkommen meinen herzlichen und ehrerbietigen Dank aussprechen.

Experimenteller Teil.

Bezüglich der allgemeinen Methodik kann auf die erste Mitteilung verwiesen werden.

Die Kataphoreserichtung wurde ausschließlich mikroskopisch festgestellt.

A. Das Verhältnis der Säure- zur Basendissoziationskonstante und die Lyophobie.

1. Von Myosin aus dem Preßrückstand von Kaninchen.

Beim Waschen des frischen Preßrückstandes geht bei alkalischer Reaktion (p_H 7 bis 7,5) eine nicht unbeträchtliche Myosinmenge in Lösung. Diese diente als Stammlösung.

Nr.	Stammlösung in m/150 Acetat p_H gemessen	Fällung nach 10 Min.	Mikroskop. Kataphorese	Stammlösung in m/100 Phosph. p_H gemessen	Fällung nach 10 Min.	Mikroskop. Kataphorese
1	6,0	leicht. Trüb.	—	5,9	leicht. Trüb.	—
2	5,6	sof. geflockt	anod.	5,6	kräft. Trüb.	anod.
3	5,2	" "	?	5,2	sof. geflockt	steht still
4	4,9	" "	kath.	5,0	" "	kath.
5	4,6	Hauch	—	—	—	—

Filtrat von Nr. 3 gibt mit Sulfosalicylsäure einen Hauch von Trübung, Filtrat von Nr. 4 bleibt klar.

2. Von Myosin aus dem Preßsaft von Rana esculenta.

Der Preßsaft wurde auf das fünffache Volumen verdünnt und vorsichtig mit m/50 Essigsäure angesäuert. Die entstehende massige Flockung wandert im Preßsaft bei p_H 5,3 anodisch, bei 5,1 kathodisch. Sie wurde dann bei p_H 5,2 abzentrifugiert, der Niederschlag bis zur Leitfähigkeit des Waschwassers von $2 \cdot 10^{-5}$ ausgewaschen. In m/300 NaOH bei p_H etwa 8 löste sich ein Teil, er wurde zu Versuch a) verwendet; das Eiweiß, das dies nicht tat, diente in m/20 NaOH gelöst zu Versuch b). Die Vollständigkeit der isoelektrischen Flockung wurde mit Sulfosalicylsäure kontrolliert.

a) m/300 NaOH-Myosin.

In m/100 Acetat p_H gemessen	Fällung	Mikroskop. Kataphorese	Filtrat + Sulfosalicylsäure
5,6	+++	anod.	völlig klar
5,2	+++	?	„ „
4,9	+++	kath.	„ „

b) m/20 NaOH-Myosin.

In m/50 Acetat p_H gemessen	Fällung	Mikroskop. Kataphorese	Filtrat + Sulfosalicylsäure
5,5	+++	anod.	völlig klar
5,0	+++	kath.	„ „

B. Quellungskurven und isoelektrischer Punkt des Preßrückstandes.

Der Preßrückstand wurde mehrmals in Aqua dest. aufgeschwemmt und nach längerem oder kürzerem Stehen durch Leinwand abfiltriert (Gesamtzeit der Waschungen 2 bis 3 Tage).

In Versuch a) wurde er dann, wie er war, zur Quellung gebracht, in b) vorher mit Quarz zerrieben, der durch mehrmaliges Dekantieren entfernt wurde, in c) wurden außerdem die unzerriebenen Gewebs- und Bindegewebsfetzen vorher abfiltriert (durch Leinewand unter Druck in der Presse). Die so erhaltene feine Suspension des Versuchs c) wurde nach nochmaliger mehrfacher Waschung bei isoelektrischer Reaktion (m/600 bis m/2400 Essigsäure, Aqua dest.) mit der Pipette auf die einzelnen Zentrifugengläser verteilt. Für a) und b) erfolgte die Verteilung durch Wägung. (Über die Feststellung des Quellungsvolumens und der Löslichkeit, sowie die Art des Zentrifugierens siehe erste Mitteilung, II, E, 4 des Experimentellen Teils.)

a) Letztes Waschwasser $\Lambda = 2 . 10^{-5}$

Puffer m/100	Volumen in ccm	Differenz in Proz. des isoelektrisch. Volumens	Mikroskop. Kataphorese	p_H	Überst. Lösung + Sulfosalicylsäure
Acetat	2,4	+ 20	—	6,3	leicht. Trüb.
„	2,35	+ 17	—	6,2	klar
„	2,15	+ 7	anod.	5,9	„
„	2,0	+ 0	?	5,3	„
„	2,0	+ 0	kath.	5,0	„
„	4,3	+ 115	—	4,5	dickmilchig

b) 2 Tage gehalten bei Λ = etwa $5 . 10^{-5}$

Puffer m/100	Volumen in ccm	Differenz in Proz. des isoelektrisch. Volumens	Kataphorese	p_H	Überst. Lösung + Sulfosalicylsäure
Phosphat	3,2	+ 64	—	7,2	Hauch
„	2,8	+ 44	—	6,8	„
„	2,5	+ 28	—	6,2	„
Acetat	2,25	+ 15	anod.	6,1	klar
„	2,0	+ 3	„	5,4	„
„	1,95	+ 0	kath.	5,0	„
„	2,3	+ 18	„	4,7	„

c) Letztes Waschwasser $\Delta = 4 \cdot 10^{-5}$

Puffer m/100	Volumen in ccm	Differenz in Proz. des isoelektrisch. Volumens	Mikroskop. Kataphorese	p_H	Überst. Lösung + Sulfosalicylsäure
Phosphat	2,5	+ 67	—	7,1	Flockung
"	1,6	+ 7	—	6,3	leicht. Opal.
Acetat	1,5	+ 0	—	6,2	" "
"	1,5	+ 0	—	5,8	Hauch ?
"	1,5	+ 0	anod.	5,3	klar
"	1,5	+ 0	kath.	4,7	leicht. Opal.
"	2,5	+ 67	"	4,5	trübe Gallerte

Puffer m/100	Volumen in ccm	Differenz in Proz. des isoelektrisch. Volumens	Kataphorese	p_H	Überst. Lösung + Sulfosalicylsäure
Es wurde soviel NH_4Cl zugegeben, daß eine 5proz. Lösung resultierte	3,05	+ 103	—	6,9	—
	1,7	+ 14	—	6,1	—
	1,5	+ 0	—	5,9	—
	1,4	— 7	—	5,7	—
	1,3	— 14	—	5,3	—
	1,35 *)	— 10	—	4,5	—

*) Volumen erscheint zu groß, da die auf NH_4Cl-Zusatz entstehenden grobklumpigen Flocken sich nicht lückenlos absetzen.

Das NH_4Cl-Myosin von c) nach nochmaligem Aufschütteln 12 Stunden stehengelassen und dann zentrifugiert, gibt:

Bei p_H	6,9	6,1	5,9	5,7	5,3	4,5
Ein Volumen (vgl. entspr. Spalte von c) in ccm .	1,4	1,0	1,45	1,1	1,25	1,35
Überst. Lösung + Sulfosalicylsäure	++++++++ (käs. Gallerte)	++++	++++	+++(+)	+++	+

C. Die Koagulationstemperaturkurve.

Die allgemeine Anlage der Versuche ist im allgemeinen Teil beschrieben worden. Die Methodik des Erwärmens geht aus der ersten Mitteilung, Experimenteller Teil, II, H, 1 hervor. Da diese Versuche die ersten ihrer Art waren, ist die Erwärmungszeit bis zur Flockung noch nicht so genau konstant wie bei den entsprechenden Versuchen am Myogen. Es werden die Protokolle der Kurven I und III der Abb. 4 als Beispiel angegeben. Nachdem die Lösungen 3 Minuten auf der Flockungstemperatur gehalten waren, wurde die Vollständigkeit der Fällung am Filtrat mit Sulfosalicylsäure geprüft.

Die Stammlösung ist dieselbe wie unter A, 1.

6 ccm Stammlösung in m/120	p_H gemessen	Flockung bei	Dauer des Erwärmens bis zur Flockung Min.	Filtrat + Sulfosalicylsäure
Phosphat	6,9	100° nicht	2	flockt
"	6,4	60°	2½	opalesziert
" + H_3PO_4 . .	6,0	36	2	leicht trübe
" + " . .	5,9	32	2	" "
" + " . .	5,3	24	2	opalesziert
" + " . .	4,9	24	2	Hauch
" + " . .	4,5	100	2½	klar
6 ccm Stammlösung + 0,5 g NH_4Cl in m/120				
Phosphat	7,15	60	2	Spur Hauch
"	6,9	55	2	Hauch
"	6,2	55	1½	"
"	5,9	50	1½	Spur Hauch
" + H_3PO_4 . .	5,6	45	2	klar
" + " . .	5,4	35	3	Hauch
" + " . .	5,0	25	1	"
" + " . .	4,7	20	1	"
" + " . .	4,5	20	1	"
" + " . .	4,3	20	1	klar

D. Die Koagulation in 8proz. NH_4Cl bei 50 bis 52°.

Die Stammlösung ist dieselbe wie unter C.

6 ccm Stammlösung + 0,5 g NH_4Cl in m/120 Phosphat p_H gemessen	7,15	6,9	6,2	5,85
Filtrat + Sulfosalicylsäure nach 10 Min. auf 50—52°	höchstens Opaleszenz			

Anhang.

Wanderungsumschlag im Preßsaft.

1. Kaninchen: Makroskopische Kataphorese.

Preßsaft auf das 4fache Vol. verd. Λ =	p_H gemessen vorher	p_H gemessen nachher	Seite Λ =	p_H und Flockung bei 100° am Schluß des Anodenteils	p_H und Flockung bei 100° am Schluß des Kathodenteils	Versuchsdauer Min.
3,0 . 10^{-3}	4,93	4,93	3,0 . 10^{-3}	klar	nach Neutr. milchig. flockt	30
2,88 . 10^{-3}	6,6	6,6	2,898 . 10^{-3}	6,6 milchig	6,6 Hauch	30
2,35 . 10^{-3}	6,9	6,9	2,37 . 10^{-3}	6,9 trübe	6,8 völlig klar	30

2. Rana esculenta.

Stammlösung: Preßsaft auf etwa dreifaches Volumen verdünnt.

2 ccm Stammlösung + Essigsäure p_H gemessen	Spontanflockung	Mikroskop. Kataphorese	Mikroskop. Kataphorese des auf 50° erwärmten Filtrats
6,4	(+)	—	anod.
6,0	+	—	?
5,7	++	anod.	kath.
5,0	+++	steht still	–
4,7	+	kath.	—

Autorenverzeichnis.

